

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DE LA
MAÎTRISE EN GÉNIE
CONCENTRATION TECHNOLOGIES DE LA SANTÉ
M. Ing.

PAR
Audrey FERLATTE

CONCEPTION D'UN REVÊTEMENT BIOACTIF POUR IMPLANT
CARDIOVASCULAIRE PAR LA MÉTHODE DU LAYER-BY-LAYER

MONTREAL, LE 9 SEPTEMBRE 2014



Audrey Ferlatte, 2014



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de mémoire
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Ricardo Zednik, président du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Vladimir Brailovski, membre du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 13 AOÛT 2014

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Sophie Lerouge, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Sa patience, sa générosité et son savoir-faire ont rendu ce projet possible et en ont fait une expérience très enrichissante.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres du LBeV qui ont su me soutenir tout au long de mon projet et qui ont partagé avec moi leur expertise et leurs conseils. Vous avez tous contribué à faire de mon passage au laboratoire une expérience enrichissante tant sur un plan professionnel que personnel. J'aimerais particulièrement remercier Élias Assaad, Pauline Lequoy, Pradeep Thalla, Deborah Beillevaire et Anaïs Aulas pour leurs conseils et expertise scientifique auxquels j'ai fait appel de nombreuses fois pendant mon projet. De plus, j'aimerais remercier Marion Maire pour le temps qu'elle a passé au laboratoire pour mes expériences de culture cellulaires.

Je voudrais remercier ma famille : Louise, Michel, Annie et Jean-Christophe, ma famille de bateau dragon Phoenix ainsi que tous mes amis. Merci de m'avoir écoutée, encouragée et soutenue dans les moments difficiles, sans vous, rien n'aurait été possible.

Finalement, j'aimerais remercier les membres de mon jury d'avoir pris de temps d'évaluer mon projet et d'y avoir apporté leurs corrections à mon mémoire.

CONCEPTION D'UN REVÊTEMENT BIOACTIF POUR IMPLANT CARDIOVASCULAIRE PAR LA MÉTHODE DU LAYER-BY-LAYER

Audrey FERLATTE

RÉSUMÉ

La technique du layer-by-layer (LbL) constitue une approche intéressante pour modifier la surface des implants afin d'améliorer leur biocompatibilité et leur performance clinique. L'objectif global de ce projet consiste à concevoir un revêtement de type LbL permettant de favoriser l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) sur et à proximité des endoprothèses couvertes, utilisées pour le traitement minimalement invasif des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA).

Dans le cadre de ce projet, plusieurs revêtements LbL ont été mis au point et étudiés. Certains contiennent du facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) que l'on cherche à relarguer afin de stimuler les VSMC. Ainsi, des films formés à l'aide de chitosane (CHI), de sulfate de chondroïtine (CS), de collagène (COL) et de bFGF ont été développés sous la forme des revêtements suivants : a) [CS/CHI]; b) [CS/COL] et c) [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL]. Ceux-ci ont été caractérisés à l'aide de plusieurs techniques telles que la microbalance à cristal de quartz (QCM-D), l'angle de contact, l'ellipsométrie, la microscopie à force atomique (AFM), le titrage immunoenzymatique utilisant un antigène absorbé (ELISA) et enfin, la culture (adhésion, croissance et survie) des VSMC.

La faisabilité de créer les revêtements LbL avec ces biomolécules a été démontrée, grâce aux résultats QCM-D qui montrent une addition de masse après chaque dépôt de polyélectrolyte indiquant une formation linéaire des films. Cette dernière a été confirmée par ellipsométrie. Les résultats d'angle de contact et d'AFM ont quant à eux montré que les films formés possédaient bien une structure LbL étant donné l'alternance des angles de contacts entre les différentes couches de même que les changements de morphologie de surface et de rugosité entre les dépôts des différents polyélectrolytes. Les films LbL [COL/CS] se sont avérés beaucoup plus efficaces que les films [CHI/CS] pour favoriser l'adhésion cellulaire. L'ELISA a démontré que le film [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL] permet d'accumuler et de relarguer du bFGF tandis que les essais de survie cellulaire des VSMC en présence de bFGF en solution ont révélé qu'une concentration de 10ng/ml était suffisante pour avoir un effet significatif sur la survie cellulaire. Il est toutefois à souligner que l'effet du film LbL sur la survie des VSMC est incertain étant donné que, dans les conditions testées, les quantités de facteurs de croissance relâchées sont substantiellement plus faibles que celles testées *in vitro*.

En conclusion, bien que des essais complémentaires doivent être effectués, les films LbL constituent une approche prometteuse pour améliorer la guérison autour des endoprothèses couvertes, améliorer leur fixation au vaisseau sanguin et limiter la progression de l'anévrisme.

Mots clés : Biomatériaux, Layer-by-Layer, QCM-D, angle de contact, ellipsométrie

DESIGN OF A LAYER-BY-LAYER BIOACTIVE COATING FOR CARDIOVASCULAR IMPLANT

Audrey FERLATTE

ABSTRACT

The Layer-by-layer (LbL) technique is an interesting approach to modify implant surfaces to improve biocompatibility and clinical performance. The main objective of this project is to conceive an LbL coating that is able to promote vascular smooth muscle cell (VSMC) adhesion, proliferation and migration on and around stent grafts, an implant used to treat abdominal aorta aneurisms (AAA) in a minimally invasive way.

For the purpose of this project, several LbL coatings were prepared, including some which contain fibroblast growth factor (bFGF) intended to be released and stimulate VSMC. The developed films were made of chitosan (CHI), chondroitin sulfate (CS), collagen (COL), as well as bFGF, and were built according to the following structures: a) [CS/CHI]; b)[CS/COL] et c) [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL]. They were characterized by techniques such as quartz crystal microbalance (QCM-D), contact angle, ellipsometry, atomic force microscopy (AFM), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by cell culture tests on VSMC (adhesion, growth and survival).

The feasibility of creating such an LbL coating was demonstrated by the QCM-D results that show a mass addition after every polyelectrolyte deposition leading to a linear growth of the film, as confirmed by ellipsometry. The contact angle and AFM results exhibited alternating angles as well as change in roughness between the depositions showing that the coatings are grown in an LbL fashion. The LbL [COL/CS] were more efficient than [CHI/CS] coatings to promote cell adhesion. ELISA results showed that [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL] films are able to accumulate and release bFGF. The survival tests on VSMC with bFGF in solution showed that a 10ng/ml concentration was sufficient to significantly improve cell survival. However, for the tested conditions, since the amount of released growth factor is much smaller than the one tested *in vitro*, the effect of the LbL on VSMC survival is uncertain.

In conclusion, although additional testing is needed, the LbL coatings are a promising approach to stimulate healing around stent grafts in order to improve fixation to the blood vessel and to limit aneurysm progression.

Keywords: Biomaterials, Layer-by-Layer, QCM-D, contact angle, ellipsometry

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Problématique clinique	3
1.1.1 Physiopathologie des anévrismes de l'aorte abdominale.....	3
1.1.2 Traitement des AAA.....	4
1.1.3 Limites du traitement endovasculaire	5
1.1.4 Mécanisme de guérison vasculaire	6
1.2 Modification de surface pour favoriser la guérison des vaisseaux sanguins	8
1.2.1 Généralités	8
1.2.2 Modifications de surface des EC	9
1.3 Revêtements multicouches à base de polyelectrolytes	11
1.3.1 Principe	11
1.3.2 Nomenclature.....	13
1.3.3 Paramètres de fabrication à considérer	13
1.3.4 Mécanismes et interactions impliqués dans la croissance des films layer-by-layer	17
1.4 Biomimétisme	23
1.4.1 Le biomimétisme par LbL	24
CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	33
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODE	35
3.1 Conception d'un revêtement LbL	35
3.2 Développement des films LbL.....	36
3.3 Paramètres de fabrication des films LbL	38
3.3.1 Préparation des substrats.....	38
3.3.2 Préparation des revêtements LbL.....	40
3.4 Caractérisation des revêtements.....	41
3.4.1 Caractérisation des propriétés physiques et chimiques.....	41
3.4.2 Caractérisation des performances du LbL	52
3.5 Analyses statistiques	56
CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET ANALYSE.....	59
4.1 Objectif A : Capacité à construire un film LbL à l'aide de substances d'intérêt.....	59
4.1.1 Caractérisation du film [CS/CHI]	59
4.1.2 Caractérisation du film [CS/COL].....	65
4.1.3 Caractérisation du film [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL].....	70
4.2 Objectif B : Capacité à produire un revêtement LbL sur un substrat de L-PPE :N.....	73
4.3 Objectif C : Capacité à libérer des molécules d'intérêt	77
4.4 Objectif D : Capacité à améliorer l'adhésion, la croissance et la survie des VSMC.....	79
4.4.1 Efficacité du bFGF sur les VSMC	79

4.4.2	Effet des revêtements LbL sur l'adhésion et la croissance des VSMC	82
4.4.3	Adhésion	84
4.4.4	Croissance	86
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET LIMITES	89
CONCLUSION	99
ANNEXE I	RÉSULTATS DES TESTS D'ÉTENDUE MULTIPLE POUR LES ESSAIS DE CULTURE CELLULAIRE.....	101
ANNEXE II	TEST ELISA PRÉLIMINAIRE	103
ANNEXE III	COMPARAISON DES MODÈLES ALTERNATIFS DE RÉGRESSION	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		111

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1 Aorte abdominale saine (gauche) et aorte abdominale atteinte d'un anévrisme (droit)	4
Figure 1.2 a) Schématisation du traitement traditionnel des AAA b) Exemple d'EC c) Schématisation de l'installation des EC	5
Figure 1.3 a) Un contact inadéquat entre l'EC et le vaisseau sanguin peut causer des fuites b) Microphotographie d'une artère coronaire distale droite avec athérosclérose	6
Figure 1.4 Processus de fabrication (a) menant à la formation d'un film de structure LbL (b)	12
Figure 1.5 Exemple d'un film LbL décrit comme $[A/B]_2-[C/D]_2$	13
Figure 1.6 Schématisation des deux types de surcompensation: intrinsèque (haut) et extrinsèque (bas).....	19
Figure 1.7 Les trois mécanismes principaux de relargage par film LbL : (a) la diffusion, (b) la dégradation et (c) le relargage déclenché par un stimulus chimique	21
Figure 1.8 Exemple d'un profil de relargage	22
Figure 1.9 Schématisation des interactions entre la MEC et les cellules	24
Figure 1.10 Une molécule typique de collagène composée de trois chaînes de polypeptide (chaînes α) (a)assemblées dans une structure hélicoïdale (b)	26
Figure 1.11 Structure du sulfate de chondroïtine A.....	29
Figure 1.12 Structure du chitosane	30
Figure 3.1 Composition du LbL $[CS/CHI]_3 - [CS/bFGF]_2 - [CS/COL]_3$	35
Figure 3.2 Techniques de caractérisation utilisées pour la validation des objectifs spécifiques fixés	37
Figure 3.3 Réacteur de décharge lumineuse de radiofréquence utilisé dans la fabrication du L-PPE :N	39
Figure 3.4 Le système E4 de Q-Sense (a) permet de suivre en temps réel la fabrication en parallèle de quatre surfaces sur ses capteurs (b)	42

Figure 3.5	Schématisation du fonctionnement des capteurs de quartz QCM-D.....	43
Figure 3.6	Schématisation du principe de mesure de la dissipation	44
Figure 3.7	Valeurs de fréquence et de dissipation pour la construction d'un film [CS/CHI]. Les courbes bleues représentent la fréquence (F3 à F13) et les courbes oranges, la dissipation (D3 à D13) pour les harmoniques impaires de 3 à 13.....	46
Figure 3.8	Schématisation d'une goutte pour la mesure d'angle de contact et des interfaces en présence.....	47
Figure 3.9	Configuration d'un ellipsomètre	49
Figure 3.10	Configuration d'un appareil AFM.....	50
Figure 3.11	Schématisation du principe des étapes d'un ELISA sandwich.....	55
Figure 3.12	Exemple de boîtes à moustaches avec encoches sur la médiane.....	57
Figure 4.1	Résultats types de fréquence et de dissipation type pour un film LbL [CS/CHI] sur un substrat d'or	60
Figure 4.2	Épaisseurs calculées par le modèle de Voigt après chacune des étapes de rinçage pour la formation d'un revêtement LbL [CS/CHI] sur un substrat d'or (n=12)	62
Figure 4.3	Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/CHI] sur un substrat de verre aminé (n = 3)	63
Figure 4.4	AFM : images topographiques (a,b) et images de phase (c,d) d'un substrat de verre aminé (a et c) et d'un film [CS/CHI] ₃ sur verre aminé (b et d).....	64
Figure 4.5	Résultat type de fréquence et de dissipation pour la formation d'un film [CS/COL] sur un substrat d'or	65
Figure 4.6	Épaisseurs calculées par le modèle de Voigt après chacune des étapes de rinçage pour la formation d'un revêtement LbL [CS/COL] sur un substrat d'or (n=12).....	67
Figure 4.7	Épaisseurs issues de l'ellipsométrie pour un film [CS/COL] sur un substrat de L-PPE:N, n=3	68
Figure 4.8	Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/COL] sur un substrat de verre aminé n = 3	69

Figure 4.9	Images topographiques (a,b) et images de phase (c,d) en AFM d'un film [CS/COL] ₂ -CS (a et c) et d'un film [CS/COL] ₃ (b et d).....	70
Figure 4.10	Courbe type pour la formation de couches [CS/bFGF] effectuées sur des couches de base [CS/CHI] ₃ préalablement fabriquées sur les capteurs.....	71
Figure 4.11	Masses calculées par le modèle de Voigt pour la fabrication d'un film [CS/CHI] ₃ - [CS/bFGF] ₂ - [CS/COL] ₃	73
Figure 4.12	Résultat type de fréquence et de dissipation pour la formation d'un film [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N.....	74
Figure 4.13	Épaisseurs moyennes calculées par le modèle de Voigt ainsi que régressions pour la fabrication de films [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE :N (n = 9 pour le film LbL et n=2 pour le contrôle L-PPE :N)	75
Figure 4.14	Épaisseurs déterminées par ellipsométrie pour un film [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N (n = 3)	76
Figure 4.15	Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N.....	77
Figure 4.16	Quantité cumulative de bFGF relargé pendant 5 jours à 37°C sous agitation (n=2)	78
Figure 4.17	Viabilité moyenne des VSMC par rapport à J0 en milieu.....	80
Figure 4.18	Boîtes à moustache représentant les données obtenues pour tous les échantillons de culture en milieu sans sérum après 5 jours (n=12).....	81
Figure 4.19	Fluorescence moyenne et écarts types pour une adhésion en milieu complet pendant 24h des VSMC sur différentes surfaces LbL (n = 4).....	83
Figure 4.20	Fluorescence moyenne et écarts types pour la croissance des VSMC sur différentes surfaces LbL pendant 1, 4 et 7 jours suite à une adhésion en milieu sans sérum (n=12)	84
Figure 4.21	Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues pour l'adhésion des VSMC sur différents types de surface (n=12)	85
Figure 4.22	Images types suite à une coloration au cristal violet après 4 heures d'adhésion en milieu sans sérum des VSMC sur les surfaces LbL (échelle 100 µm)	86
Figure 4.23	Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues après 4 jours de croissance des VSMC en milieu complet sur différents types de surface (n=12)	87

Figure 4.24	Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues après 7 jours de croissance des VSMC en milieu complet sur différents types de surface (n=12)	88
-------------	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AFM	Microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes (basic fibroblast growth factor)
CHI	Chisosane
COL	Collagène
CS	Sulfate de chondroïtine (chondroitin sulfate)
EC	Endoprothèse couverte
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme (epidermal growth factor)
ELISA	Titration immunoenzymatique utilisant un antigène absorbé (enzyme-linked immunosorbent assay)
ePTFE	Polytétrafluoro-éthylène expansé (expanded polytetrafluoro-ethylene)
GAG	Glycosaminoglycane
LBeV	Laboratoire de biomatériaux endovasculaires
LbL	Layer-by-Layer
L-PPE :N	Polyéthylène polymérisé plasma à basse pression riche en amine (low-pressure plasma polymerised nitrated ethylene)
MEC	Matrice extra cellulaire
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Poly(éthylène téréphtalate)
pH	Potentiel hydrogène
PI	Point isoélectrique
pKa	Constante de dissociation acide

PKb	Constante de dissociation basique
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec module de dissipation (quartz crystal microbalance with dissipation)
VSMC	Cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC) (vascular smooth muscle cell)

INTRODUCTION

Les modifications de surface des implants et plus particulièrement les revêtements bioactifs, constituent une approche de plus en plus utilisée pour optimiser la biocompatibilité des implants sans altérer leurs propriétés mécaniques et leur fonction. Les revêtements de type couche par couche, couramment appelés layer-by-layer (LbL), constituent une approche particulièrement intéressante puisqu'entre autre, leur fabrication est simple, ne requiert pas d'équipement coûteux et surtout, permet l'immobilisation d'une grande quantité de molécules bioactives ainsi que, dans certains cas, leur relargage selon un profil qui peut être ajusté.

Dans ce cadre de ce projet de maîtrise, on s'est intéressé à créer des revêtements LbL pour un type d'implant particulier, les endoprothèses couvertes (EC), qui sont utilisées pour prévenir la rupture des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA).

Les EC sont déployées dans les anévrismes via cathéter, par une procédure minimalement invasive, ce qui lui confère de nombreux avantages par rapport à la chirurgie conventionnelle, tels que la réduction des risques opératoires, une période de convalescence plus courte, un taux de morbidité et de mortalité plus faible à court terme (Arko et al., 2012; Dangas et al., 2012; Schermerhorn et al., 2008). Toutefois, la pose d'une EC implique un taux relativement élevé de complications à moyen et long terme. Elles peuvent être associées au manque de guérison autour de l'implant, causé entre autre par l'inertie du matériau qui recouvre les implants.

Cette constatation mène naturellement à l'objectif principal de ce projet qui est la modification de surface des EC afin de stimuler les mécanismes de guérison vasculaire pour ultimement améliorer les performances cliniques du traitement endovasculaire. Plus spécifiquement ce projet vise à créer un revêtement de type LbL en intégrant des substances qui favoriseront principalement l'adhésion, la croissance et la prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC) qui jouent un rôle clé dans le processus de guérison.

Le chapitre I de ce mémoire abordera tout d'abord la problématique clinique liée aux AAA ainsi que le mécanisme de guérison vasculaire. Une revue de littérature sera effectuée sur les techniques de modifications de surface pour les EC développées au LBeV ainsi que, de manière plus approfondie, sur le LbL, dont les mécanismes et les avantages seront présentés. Le concept de biomimétisme sera abordé, car il détermine le choix des substances intégrées dans la fabrication du revêtement étudié dans ce projet. Les chapitres II et III porteront respectivement sur les objectifs et sur la méthodologie employée pour fabriquer et caractériser, tant de façon physico-chimique que biologique. Le chapitre IV présentera les résultats obtenus et ils seront discutés dans le chapitre V.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Problématique clinique

1.1.1 Physiopathologie des anévrismes de l'aorte abdominale

Un anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une dilatation localisée et permanente de la paroi de l'aorte située dans le segment abdominal et qui excède 50% du diamètre normal de ce vaisseau sanguin (Figure 1.1) (Akers et Kerstein, 2014). La complication la plus sérieuse liée à l'AAA est sa rupture : celle-ci provoque une hémorragie telle qu'elle mène à la mort dans plus de 80% des cas (Nordon et al., 2011) d'où l'importance de détecter et de traiter efficacement les AAA.

Les AAA sont causés dans environ 90% des cas par l'athérosclérose (Greenhalgh et Powell, 2008; Nordon et al., 2011). Au niveau pathologique, les anévrismes sont associés à un taux anormalement élevé d'apoptose¹(Henderson et al., 1999) des cellules musculaires lisses (VSMC), une dégradation de la matrice extracellulaire et à l'inflammation du vaisseau sanguin, ce qui diminue significativement le soutien mécanique apporté à la paroi des vaisseaux (Greenhalgh et Powell, 2008; Nordon et al., 2011; Sakalihasan, Limet et Defawe, 2005).

¹ Phénomène de mort cellulaire programmée

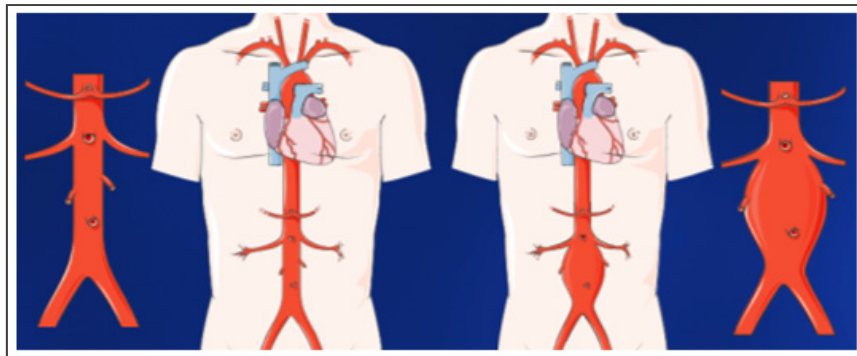


Figure 1.1 Aorte abdominale saine (gauche) et aorte abdominale atteinte d'un anévrisme (droit)
Tirée de Servier Medical Art

1.1.2 Traitement des AAA

Traditionnellement, le traitement des AAA s'effectue via une chirurgie ouverte illustrée à la Figure 1.2 a). En résumé, cette intervention consiste à suturer un tube de polymère à l'aorte afin d'éliminer l'anévrisme de la circulation sanguine. Étant donné le caractère invasif de cette intervention, tous les patients ne sont pas de bons candidats pour cette procédure. Par exemple, l'âge, la présence de maladies cardiovasculaires ou de comorbidité majeure sont des facteurs de risque importants (Dangas et al., 2012).

Pour réduire les risques opératoires, une stratégie novatrice a été développée dans les années 90 par Parodi et collaborateurs (Parodi, Palmaz et Barone, 1991) : la pose d'une endoprothèse couverte (EC) par voie endovasculaire. Les EC consistent en un tube de polymère, soit de polyéthylène téréphtalate (PET) tissé ou polytétrafluoro-éthylène expansé (ePTFE), muni d'une armature métallique (Figure 1.2 b) et sont insérées par cathéter ce qui rend l'intervention minimalement invasive. Pour ce faire, une petite incision est pratiquée au niveau de l'aîne du patient afin d'insérer un guide dans l'artère fémorale. À l'aide d'une image obtenue par fluoroscopie, celui-ci est dirigé jusqu'à l'emplacement de l'anévrisme et un cathéter est ensuite glissé sur le guide. Finalement, l'EC, qui se trouve sous sa forme comprimée à l'intérieur du cathéter, est déployée (Figure 1.2 c).

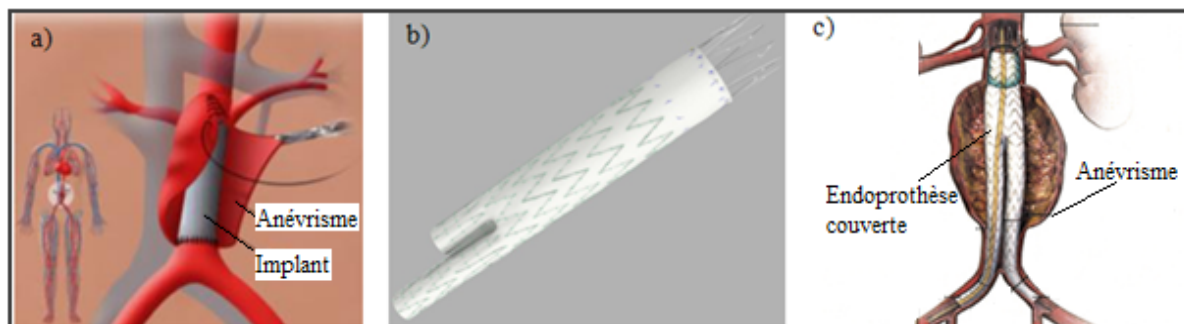


Figure 1.2 a) Schématisation du traitement traditionnel des AAA - Adaptée de (Vein center at memorial hospital, 2014) b) Exemple d'EC – Tirée de Zenith flex de Cook medical, Bloomington, États-Unis c) Schématisation de l'installation des EC – Adaptée de (Greenhalgh et Powell, 2008)

Les EC comportent de nombreux avantages par rapport à l'intervention chirurgicale traditionnelle tel qu'une période de convalescence plus courte et, à court terme, un taux de morbidité et de mortalité plus faible (Arko et al., 2012; Dangas et al., 2012; Schermerhorn et al., 2008). Le caractère non invasif de cette intervention en fait une alternative de choix pour les patients à risque pour la chirurgie (Dangas et al., 2012).

1.1.3 Limites du traitement endovasculaire

Les résultats à long terme de l'intervention par EC sont toutefois insatisfaisants par rapport à la chirurgie étant donné les complications qui s'y rattachent. Les plus fréquentes sont les endofuites (Figure 1.3 a) et la migration de la prothèse à l'intérieur de l'aorte (Arko et al., 2012; Greenhalgh et Powell, 2008). Celles-ci provoquent la persistance d'un flux sanguin dans l'anévrisme ce qui peut engendrer une rupture et nécessite souvent une ré-intervention pouvant aller jusqu'à une conversion à la chirurgie (Greenhalgh et Powell, 2008). Par conséquent, la pose d'une EC nécessite un suivi à vie par imagerie médicale afin de surveiller ces éventuelles complications. Ainsi, les risques et les coûts associés aux EC font en sorte qu'elles ne sont généralement pas favorisées par rapport à la chirurgie traditionnelle malgré les avantages qu'elles offrent (Schermerhorn et al., 2008).

Les complications liées à la pose d'une EC sont principalement attribuables à l'étanchéité insuffisante entre l'implant et l'aorte due à un contact inadéquat entre les deux. D'ailleurs, un bon contact est particulièrement difficile à obtenir lorsqu'il y a présence d'athérosclérose (principale cause des AAA), étant donné la géométrie irrégulière de la lumière du vaisseau (Kusanagi et al., 2007; Major et al., 2006) (Figure 1.3 b).

La fixation et l'étanchéité des EC reposent sur la guérison des tissus autour de l'implant, particulièrement au niveau des cols de l'anévrisme. Ce phénomène n'a toutefois pas lieu dans de nombreux cas, ce qui peut être attribuable en grande partie au matériau de fabrication des implants ainsi qu'à la physiopathologie particulière des anévrismes (Major et al., 2006).

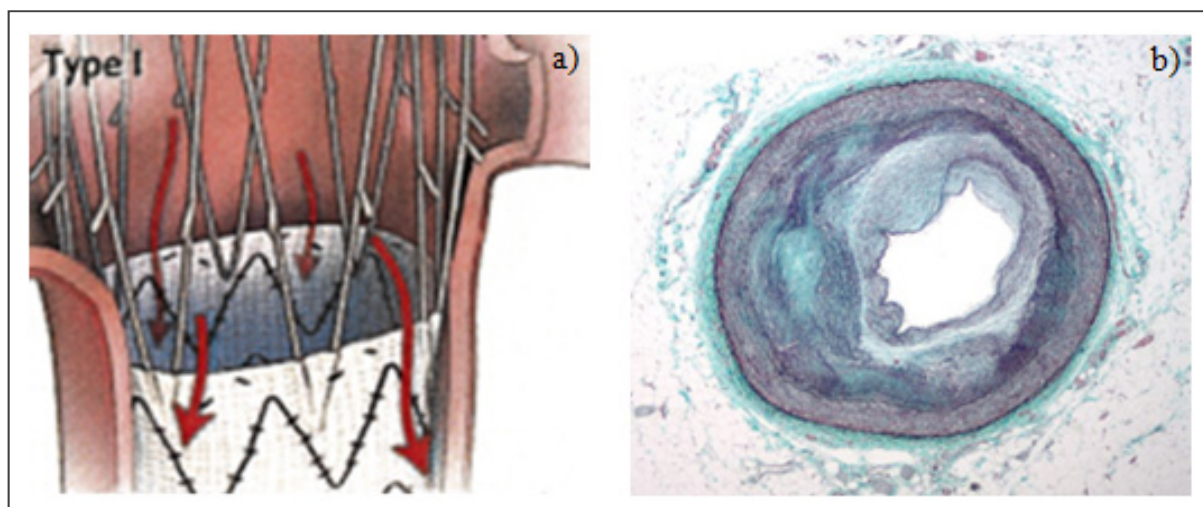


Figure 1.3 a) Un contact inadéquat entre l'EC et le vaisseau sanguin peut causer des fuites – Tirée de (Greenhalgh et Powell, 2008) b) Microphotographie d'une artère coronaire distale droite avec athérosclérose – Tirée de (Wikipedia, 2014)

1.1.4 Mécanisme de guérison vasculaire

Comme la guérison des tissus autour de l'EC est un phénomène clé pour la performance de cet implant, il est essentiel de connaître les principaux mécanismes menant à la guérison vasculaire, et ce, dans le contexte des EC.

Idéalement, la guérison du caillot sanguin engendrée par la pose de l'EC devrait mener à la fixation biologique de la prothèse à la paroi de l'aorte. Le processus dont il est ici question s'apparente à celui qui se produit suite à une lésion. Il se déroule en quatre étapes principales : 1) l'hémostase ; 2) l'inflammation ; 3) la prolifération ; 4) le remodelage

- 1) L'hémostase consiste principalement en une série de réactions permettant d'arrêter le saignement lors de la rupture d'un vaisseau sanguin. Ainsi, suite à la vasoconstriction du vaisseau sanguin provoqué par la lésion, un clou plaquettaire sera créé par l'adhésion des plaquettes les unes aux autres et aux fibres de collagène exposées par l'endothélium endommagé. Finalement, un caillot de fibrine issue d'un processus à plusieurs étapes est formé afin de solidifier le clou plaquettaire (Boucher et al., 2010; Marieb, 2005). Dans le cas des EC, un caillot sanguin se forme autour de l'implant, dans le sac anévrysmal, à cause de la stagnation du sang causée par l'EC ainsi que de l'endommagement de la couche de cellules endothéliales du vaisseau occasionnée par la pose de l'implant.
- 2) Les macrophages et neutrophiles arrivent sur le site de la blessure afin de débarrasser tout débris.
- 3) Le processus de coagulation et les cellules inflammatoires génèrent le relargage de différents médiateurs qui attirent et stimulent des cellules responsables de la guérison tels que les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Ainsi, des tissus de granulation, qui forment en fait une matrice extracellulaire vascularisée, seront produits afin de remplacer le caillot de fibrine. Dans le cas des EC, on remarque que le processus d'invasion de ce caillot de fibrine ne s'effectue généralement pas bien ou très lentement. Ainsi, plusieurs années après l'implantation, on peut observer la persistance de cellules inflammatoires et d'un caillot sanguin désorganisé dépourvu de VSMC, de fibroblastes et de fibres de collagène (Major et al., 2006). Cette étape du processus de guérison ne se complète donc pas suite à la pose d'une EC et, par

conséquent, le processus de guérison ne s'achève pas, ce qui empêche la fixation adéquate de l'implant.

L'absence de guérison est donc principalement attribuable à un manque d'invasion et de prolifération de cellules vasculaires sur et autour de l'implant et peut s'expliquer par différents facteurs tels que la physiopathologie des anévrismes et l'implant lui-même. Par exemple, tel qu'exposé plus tôt, la paroi anévrismale est entre autre caractérisée par une déplétion cellulaire et un taux anormalement élevé d'apoptose chez les VSMC (Henderson et al., 1999). De plus, la pose de l'EC exclut le sac anévrisimal du flux sanguin et a pour conséquence de limiter l'accès aux nutriments et à l'oxygène aux cellules qui s'y trouvent. Les conditions ainsi créées sont davantage défavorables à la prolifération cellulaire et fragilisent par le fait même la paroi anévrismale. Enfin, bien que les matériaux dont sont recouvertes les EC (PET ou ePTFE) aient un caractère peu thrombogène ainsi que des propriétés mécaniques adéquates à ce type d'application, ils sont plutôt inertes d'un point de vue biologique, ce qui limite l'adhésion et la prolifération cellulaire à leur surface.

1.2 Modification de surface pour favoriser la guérison des vaisseaux sanguins

1.2.1 Généralités

La conception d'un implant ayant toutes les propriétés requises pour un fonctionnement idéal est une tâche complexe. Celui-ci doit posséder à la fois des propriétés de volume adéquates pour les propriétés mécaniques requises, de même que des propriétés de surfaces ayant la capacité de provoquer une réponse biologique, ce qui permettrait une intégration aux tissus environnants. Une stratégie couramment utilisée consiste à concevoir un implant possédant des propriétés mécaniques adéquates suivi d'une modification de surface afin d'améliorer la performance biologique de l'implant (Chu et al., 2002; Lerouge et al., 2007a). Les modifications de surface apportées peuvent être adaptées spécifiquement selon l'application clinique visée.

1.2.2 Modifications de surface des EC

Dans le cas spécifique des EC, à notre connaissance, peu de travaux de recherche sur les modifications de surface dans le but d'améliorer la guérison autour des SG ont été menés (Kajimoto et al., 2008; Kusanagi et al., 2007; van der Bas et al., 2002; van der Bas et al., 2004; Zhong et al., 2009). La plupart des revêtements développés ont été conçus pour le relargage d'un facteur de croissance jouant un rôle de premier plan dans la guérison des vaisseaux sanguins, le bFGF (basic fibroblast growth factor). Par exemple, dans le cas de Van der Bas et col., une prothèse imprégnée de collagène, d'héparine et de bFGF a démontrée des résultats concluants au niveau du relargage (van der Bas et al., 2002; van der Bas et al., 2004). Kajimoto et col., quant à eux, ont développé un revêtement à base d'élastine et de sel d'héparine (Kajimoto et al., 2008). Finalement, Kunasaki et col. ont développé un revêtement sous forme d'hydrogel de gélatine réticulée et imbibé de bFGF (Kusanagi et al., 2007). Dans le même groupe, un second type d'hydrogel a été développé à base de collagène servant à relarguer un plasmide (Zhong et al., 2009). Les résultats de ces travaux montrent entre autre l'intérêt du bFGF pour cette application.

Au sein du LBeV (laboratoire des biomatériaux endovasculaires, CRCHUM), plusieurs techniques de modification de surface telles que la polymérisation par plasma et le greffage de molécules bioactives ont déjà été étudiées pour améliorer la guérison autour des EC. Ces travaux sont décrits ci-après.

1.2.2.1 Polymérisation plasma

Le LBeV a développé, en collaboration avec le professeur Wertheimer de l'École Polytechnique, un revêtement polymérisé par plasma, le L-PPE :N (Low-Pressure Plasma Polymerised Nitrided Ethylene), ayant une composition élevée en azote et plus particulièrement en groupements amines primaires ($R-NH_2$) (environ 7.5%) (Mwale et al., 2011; Rampersad et al., 2011; Ruiz et al., 2010; Truica-Marasescu et Wertheimer, 2008). Lorsque ces groupements sont immergés dans une solution aqueuse à pH physiologique, ils

forment des groupements NH_3^+ , ce qui confère une charge nette positive au revêtement (Truica-Marasescu et Wertheimer, 2008). Comme beaucoup de protéines sont chargées négativement, des interactions électrostatiques se formeront avec la surface et attireront les cellules directement ou indirectement : soit par les interactions entre les protéines adsorbées sur le L-PPE :N ou par les interactions électrostatiques entre la membrane cellulaire (naturellement chargée négativement) et le revêtement. Il a d'ailleurs été démontré que ces revêtements riches en amines primaires permettent l'amélioration de l'adhésion de plusieurs types de cellules (Gigout et al., 2011; Lerouge et al., 2007b) et qu'ils peuvent être déposées sur une grande variété de substrats tel que le verre et différents types de polymères.

Les modifications de surface par L-PPE :N comportent toutefois certaines limites. Les interactions entre les cellules et la surface modifiée ne sont pas spécifiques étant donné qu'elles passent principalement par les protéines adsorbées sur le L-PPE :N; celles-ci favorisent toutes sortes de réactions biologiques et non pas uniquement l'adhésion et la prolifération de cellules vasculaires tel que souhaité dans le cas des EC. L'ajout de biomolécules permettrait de favoriser de manière plus spécifique un type cellulaire et d'activer la réaction cellulaire désirée.

1.2.2.2 Greffage de molécules bioactives

Pour cette raison, le LBeV travaille donc aussi sur l'immobilisation de biomolécules actives à la surface des EC. Des revêtements à base de chondroïtine sulfate (CS) et du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) ont été développés sur différents types de surfaces aminées, tout d'abord par formation de liaisons covalentes via les groupements amines primaires du L-PPE :N. (Charbonneau et al., 2011; Charbonneau et al., 2012). Afin d'augmenter la densité d'EGF greffé et de le rendre mieux accessible aux cellules, une technique de greffage orientée a ensuite été développée (Lequoy et al., 2014).

Le greffage de molécules bioactives permet de générer des interactions spécifiques, mais la quantité immobilisée est toutefois limitée et nécessite l'utilisation d'agents de réticulation.

De plus, aucun relargage de facteur de croissance n'a lieu, ce qui limite l'effet du revêtement à la surface de l'implant.

Une technique qui permettrait l'immobilisation et le relargage d'une grande quantité de molécules bioactives tout en favorisant les interactions spécifiques pourrait pallier aux limites auxquelles font face les modifications de surface actuellement étudiées.

Pour ces raisons, la fabrication d'un revêtement à couches multiples par layer-by-layer (LbL) à l'aide de molécules d'intérêt pourrait être une technique prometteuse dans l'amélioration des modifications de surface apportées aux EC. La prochaine section décrit en détail cette technique.

1.3 Revêtements multicouches à base de polyélectrolytes

Le LbL a été introduit dans les années 90 par Decher et collaborateurs (Decher, Lvov et Schmitt, 1994) et est utilisé dans la fabrication de films minces. Cette technique consiste traditionnellement à fabriquer des revêtements en alternant les dépôts de deux types de molécules de charges globales opposées. Les couches ainsi formées sont maintenues entre elles par des liens principalement électrostatiques.

1.3.1 Principe

La première étape de fabrication consiste à conférer une charge au substrat qui recevra le film LbL. Différentes techniques peuvent être utilisées à cette fin telles que l'hydrolyse, l'aminolisation ou le plasma. Le substrat chargé est trempé dans une solution de polyélectrolytes de charge opposée à celui-ci (Figure 1.4-A, étape 1). Il est ensuite rincé afin d'éliminer les polyélectrolytes faiblement liés et éviter la contamination de la solution suivante (Figure 1.4-A, étape 2). Finalement, le substrat est trempé dans une solution de polyélectrolytes de charge opposée à la première (Figure 1.4-A, étape 3) puis est rincé

(Figure 1.4-A, étape 4). La première couche du film LbL est désormais complète. Ces quatre étapes sont ensuite répétées autant de fois que nécessaire pour l'obtention d'un film au nombre de couches voulues.

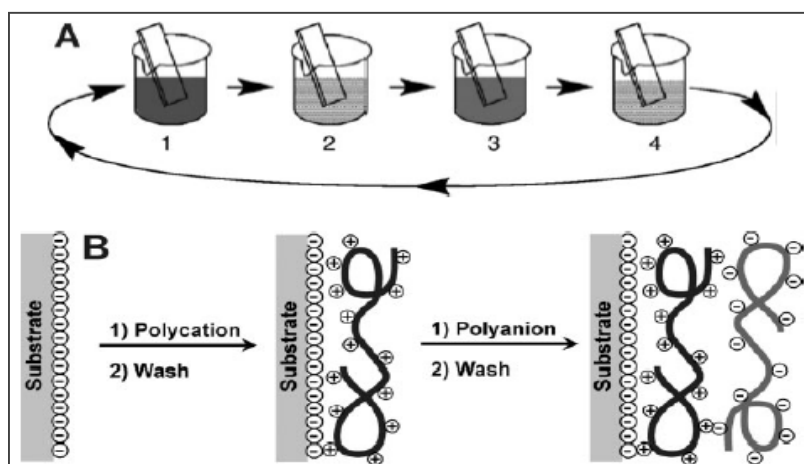


Figure 1.4 Processus de fabrication (a) menant à la formation d'un film de structure LbL (b)
Tirée de (Tang et al., 2006)

La technique du LbL comporte de nombreux avantages. Tout d'abord, cette méthode de déposition est simple et peu coûteuse étant donné qu'elle ne nécessite pas d'équipements spécialisés. Ensuite, il est possible d'effectuer la déposition, peu importe la géométrie du substrat, et, dans les bonnes conditions, les revêtements créés peuvent avoir un nombre de couches élevé (> 1000). Il est possible de créer des revêtements avec un haut degré d'organisation et ils peuvent être réalisés à l'aide d'une grande variété de molécules. Le LbL ne se limite pas aux polyélectrolytes fortement chargés : il est possible de bâtir un film en se basant sur d'autres types d'interactions tel que les ponts hydrogène ou les réactions acide-base par exemple. Finalement, cette technique ne requiert l'utilisation d'aucun produit toxique ce qui représente un avantage de taille pour les applications biomédicales. (Boudou et al., 2010; Guzmán et al., 2009; Klitzing, 2006; Knoll et Advincula, 2011; Tang et al., 2006).

1.3.2 Nomenclature

Une paire de couches, soit une couche complète ou une bicouche, est décrite comme étant $[P1/P2]$ où P1 et P2 représentent ici l'abréviation des deux polyélectrolytes composant la couche. Ensuite, lorsqu'une bicouche est répétée plusieurs fois dans la construction d'un film, elle sera décrite par $[P1/P2]_n$ où la lettre en indice représente le nombre de répétitions de la bicouche. Finalement, un film composé de plusieurs types de bicouches, soit une superstructure, sera décrit par $[P1/P2]_n-[P3/P4]_m$ où $[P1/P2]_n$ représente les couches situées entre le substrat et les couches $[P3/P4]_m$.

Par exemple, le film représenté à la Figure 1.5 se décrit comme étant : $[A/B]_2-[C/D]_2$.

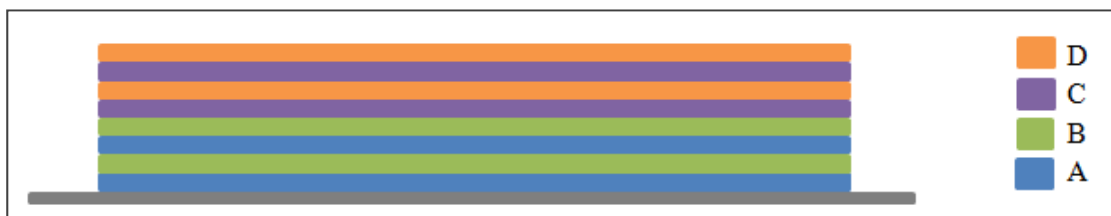


Figure 1.5 Exemple d'un film LbL décrit comme $[A/B]_2-[C/D]_2$

1.3.3 Paramètres de fabrication à considérer

La condition de base pour permettre un assemblage LbL réside dans l'utilisation de deux molécules de type polyélectrolyte qui ont une charge nette opposée lorsque solubilisées. Ensuite, plusieurs paramètres influent sur la construction du film. Certains d'entre eux sont directement liés aux polyélectrolytes utilisés tel que la densité de charge ainsi que la concentration de polyélectrolytes tandis que d'autres sont liés au solvant, tels que le pH et la concentration ionique (Costa et al., 2011; Crespilho et Iost, 2012; Guzmán et al., 2009).

1.3.3.1 Paramètres de fabrication liés aux polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont des polymères qui comportent des groupements ioniques et qui ont la capacité de se solubiliser en présence d'un solvant polaire tel que l'eau. Lorsqu'ils sont mis en solution sous les conditions appropriées, ces macromolécules se séparent en polyions (soit polycations ou polyanions) et en petits ions de charge opposée qui sont appelés contre ions (Knoll et Advincula, 2011). Beaucoup de molécules biologiques, telles que les polypeptides (composante de base des protéines) ainsi que l'ADN sont des polyélectrolytes et peuvent donc être utilisées pour la fabrication de films par la technique LbL (Tang et al., 2006).

Bien que les polyélectrolytes représentent la catégorie de polymères les plus utilisés dans la formation de film par LbL, d'autres molécules chargées peuvent aussi être utilisées à cette fin. Par exemple, il est possible de lier à un polymère des groupements ioniques afin d'en faire une molécule chargée ou d'utiliser des nanocomposantes chargées (Guzmán et al., 2009).

Densité de charge

Dépendamment de leur degré de dissociation en solution, les polyélectrolytes peuvent être classifiés selon deux types: les polyélectrolytes forts et les polyélectrolytes faibles.

Les polyélectrolytes forts ont la capacité de solubiliser tous leurs groupements ioniques lorsqu'ils sont mis en solution à un pH donné produisant une molécule chargée à sa capacité maximale.

Les polyélectrolytes faibles, quant à eux, ne se solubilisent que partiellement lorsqu'ils sont en solution et leur capacité à se solubiliser est caractérisée par une constante de dissociation (pK_a ou pK_b). Par exemple, un polyélectrolyte qui possède une constante de dissociation acide (pK_a) est soluble et chargé positivement à un pH sous le pK_a . À l'inverse, un

polyélectrolyte qui possède une constante de dissociation basique (pK_b) est soluble et chargé négativement à un pH sous le pK_b .

Certaines grosses molécules, comme les protéines, peuvent porter à la fois plusieurs groupements cations et anions solubles dont la dissociation sera caractérisée dans ce cas par un point isoélectrique (PI). Le PI représente le pH auquel la charge des ions positifs en solution est égale à celle des ions négatifs. Ainsi, la molécule ne porte aucune charge électrique nette à cette valeur de pH. À un pH sous son PI, la molécule porte une charge nette positive et vice-versa, à un pH au-dessus de son PI, sa charge nette est négative.

Plus le pH est éloigné du PI, du pK_a ou du pK_b , plus la charge nette de la molécule sera élevée. La densité de charge des polyélectrolytes faibles est ainsi directement dépendante des conditions de pH.

L'agencement des polymères en fonction de leurs densités de charge est un critère qui favorise la formation d'un film par LbL, mais qui n'est toutefois pas essentiel. En effet, un mauvais jumelage de densités de charges pourrait mener à la formation d'un film dont la croissance est non-linéaire, non-reproductible et limitée, mais plusieurs éléments doivent être pris en compte lors de l'étude de ce critère (Laschewsky et al., 2000). En effet, plusieurs cas où les densités de charges des polymères utilisés ne sont pas similaires rapportent la formation d'un film LbL. Ce phénomène est dû à l'intervention d'interactions secondaires (Costa et al., 2011). Par exemple, il est possible que la conformation d'un polymère mène à l'accumulation localisée de charges menant à une répartition non-uniforme de celle-ci. Ainsi, un polyélectrolyte faible peut potentiellement mener à la formation d'une couche dont la charge globale est élevée.

Concentration

La concentration des polyélectrolytes peut elle aussi avoir un effet sur la fabrication du film. En effet, à de basses concentrations, en fonction du polymère choisi, il est possible que la construction d'un film par LbL soit impossible. Toutefois, à des concentrations plus élevées,

ce critère n'a que peu d'impact étant donné les mécanismes qui régulent la croissance des couches et qui seront exposés plus loin (page 17). Selon Laschewsky et col., la concentration minimale des solutions de polymère est située autour de 10^{-2} mol/L (Laschewsky et al., 2000).

1.3.3.2 Paramètres de fabrication liés au solvant

Le solvant le plus commun pour la fabrication des films multicouche à base de polyélectrolytes est l'eau déionisée. La concentration ionique et le pH de ce solvant sont généralement ajustés selon le type de polyélectrolyte utilisé pour conférer certaines propriétés physiques et chimiques au film.

Concentration ionique

L'ajustement de la concentration ionique des solutions de polyélectrolytes a pour principale fonction de contrôler l'épaisseur des couches déposées. La concentration ionique est le plus souvent ajustée à l'aide d'ions Na^+ et Cl^- .

Lorsqu'un polyélectrolyte est solubilisé, des forces de répulsions s'exercent entre les groupements chargés du polymère. La molécule adopte alors une forme allongée et relâchée. En ajoutant des ions dans la solution, ceux-ci entourent les groupements ioniques du polymère ce qui a pour effet d'affaiblir le champ électrique local par un effet d'écran que l'on nomme phénomène de blindage. La molécule peut alors se replier dans une conformation semblable à celle qu'elle adopte lorsqu'elle n'est pas chargée et ainsi favoriser la formation de couches épaisses et avec une plus grande teneur en eau (Schlenoff, Ly et Li, 1998; Serizawa, Yamaguchi et Akashi, 2002). À l'opposé, les fortes concentrations ioniques auront tendance à former un blindage sur les zones chargées du polyélectrolyte réduisant ainsi sa charge effective et par le fait même, la quantité adsorbée sur le substrat (Oliveira et al., 2013). Ainsi, les solutions de polyélectrolytes contenant de très faibles concentrations ioniques auront tendance à former des couches rigides étant donné la conformation des polymères tandis que les très fortes concentrations ioniques auront tendance à former des couches contenant une quantité réduite de polymère.

L'augmentation d'ions en solutions peut aussi augmenter la rugosité des couches ce qui augmente la surface disponible pour l'adsorption de polyions. Les couches ainsi formées ont une épaisseur variable en fonction de la rugosité. Les couches qui possèdent une rugosité plus élevée sont généralement plus épaisses que les couches avec une rugosité plus faible (Guzmán et al., 2009; Richert et al., 2004).

pH

Les conditions de pH influent sur la rigidité du film qui représente un paramètre à considérer dans le cas de plusieurs applications. Par exemple, dans un cas où le LbL est en contact avec des cellules, l'adhésion de celles-ci est directement influencée par la rigidité du substrat (Boudou et al., 2010). Ainsi, le taux de prolifération cellulaire est généralement meilleur plus le substrat LbL est rigide (Boudou et al., 2010; Sailer et al., 2012). Un assemblage effectué dans un milieu possédant un pH très acide est moins rigide que lorsqu'il est effectué dans des conditions de pH près de la neutralité (Boudou et al., 2010).

De plus, dans le cas des polyélectrolytes faibles, comme le pH influe sur la densité de charge, il peut aussi avoir un effet sur l'épaisseur des couches déposées. En effet, tel qu'exposé plus tôt, une densité de charge plus élevée induit généralement la formation des couches plus minces étant donné les répulsions qui existent entre les polyélectrolytes de même charge, mais surtout à cause de l'adsorption des polyélectrolytes dans une conformation compressée (Boddohi, Killingsworth et Kipper, 2008; Choi et Rubner, 2005; Sailer et al., 2012).

1.3.4 Mécanismes et interactions impliqués dans la croissance des films layer-by-layer

Bien que le Layer-by-Layer (LbL) soit une technique de fabrication simple, la construction et le comportement du film font intervenir plusieurs mécanismes complexes.

1.3.4.1 Surcompensation des charges

La croissance des films LbL est principalement assurée par un mécanisme de surcompensation des charges. En effet, à chaque étape d'immersion dans une solution de polyélectrolytes, une certaine quantité de polyions est adsorbée à la surface du substrat, ce qui permet d'inverser la charge de ce dernier et de préparer la surface du film à l'étape d'adsorption suivante (Richert et al., 2004). Ainsi, le phénomène de surcompensation a deux conséquences principales (Knoll et Advincula, 2011) :

- 1) Il permet de réguler l'adsorption de molécules à l'intérieur d'une même couche étant donné les répulsions qui existent entre les espèces qui possèdent la même charge globale. La quantité de molécules adsorbées à l'intérieur d'une même couche est donc limitée.
- 2) Il permet de préparer le substrat pour l'étape d'adsorption suivante de molécules de charge opposée. Il ne semble pas y avoir de limitation quant au nombre de couches qu'il est possible de déposer par LbL. Des films à plus de 1 000 couches ont été rapportés dans la littérature. (Knoll et Advincula, 2011)

Deux types de surcompensation des charges sont distingués dans la littérature (Figure 1.6) : la compensation intrinsèque et la compensation extrinsèque. (Crespilho et Iost, 2012; Guzmán et al., 2009; Klitzing, 2006; Schlenoff, Ly et Li, 1998)

Compensation intrinsèque

Les charges sont exclusivement compensées par les polyions composant les couches du film (Figure 1.6, haut). Des complexes se forment entre les polyélectrolytes de charges opposées et des contre ions sont libérés. Ainsi, la quantité de contre ions présente dans le film est faible. (Klitzing, 2006)

Compensation extrinsèque

Les charges sont compensées par les ions Na^+ et Cl^- présents dans les solutions utilisées ainsi que par les polyions eux-mêmes (Figure 1.6, bas).

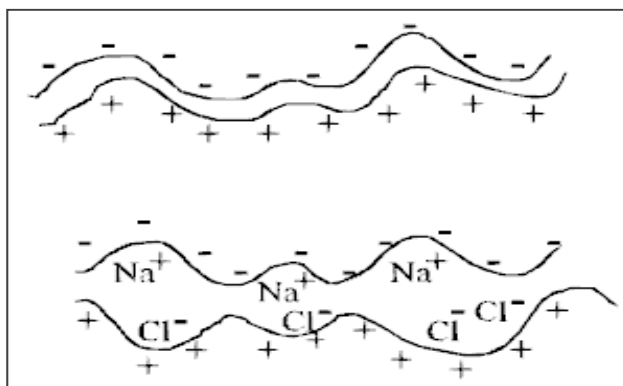


Figure 1.6 Schématisation des deux types de surcompensation: intrinsèque (haut) et extrinsèque (bas)

Tirée de (Schlenoff, Ly et Li, 1998)

Le type de compensation présent dans un film affectera directement ses propriétés. Par exemple, par rapport à un film à compensation majoritairement intrinsèque, un film multicouche contenant beaucoup d'ions Na^+ et Cl^- sera plus épais, les couches seront moins interpénétrantes et les chaînes de polymère seront plus mobiles, ce qui peut éventuellement mener à une structure de film instable (Schlenoff, Ly et Li, 1998). À l'opposé, les propriétés physiques du film auront un caractère périodique et donc prévisible lorsque l'interpénétration des couches est faible (Schlenoff et Laurent, 1997). Dans l'optique où le film est construit à des fins de relargage, une structure stratifiée favorise la compartimentation des agents bioactifs et permet un certain contrôle au niveau du profil de relargage par rapport à un film dont les couches ont un haut degré d'interpénétration (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012; Pavlukhina et Sukhishvili, 2011).

1.3.4.2 Mode de croissance linéaire vs exponentiel

Deux modes de croissance ont été rapportés dans la littérature pour les films LbL : linéaire et exponentiel. Chaque mode produit des films avec leurs caractéristiques particulières.

Les films qui ont une croissance linéaire ont tendance à avoir une structure stratifiée et les différentes couches de polyélectrolytes interpénètrent généralement seulement les couches voisines. Ce type de croissance est typique des polyélectrolytes possédant une densité de charge élevée (Boudou et al., 2010; Detzel, Larkins et Rajagopalan, 2011) et est favorisé lorsque le film est utilisé à des fins de relargage de molécules bioactives tel qu'exposé dans la section précédente.

De leur côté, les films LbL qui ont une croissance exponentielle ont tendance à avoir une structure moins définie qu'avec une croissance linéaire. Dans la littérature, plusieurs théories ont été émises pour expliquer ce mode de croissance. La principale est reliée à la diffusion de polyélectrolytes à l'intérieur du film. Les interactions entre les polyélectrolytes faiblement chargés sont insuffisantes pour qu'ils soient adsorbés seulement en surface du film. Ainsi, un excès de polyélectrolytes est absorbé à l'intérieur du film et est rediffusé vers la surface lors des étapes de fabrication subséquentes se complexant éventuellement à des polyélectrolytes de charge opposée et produisant des couches de plus en plus épaisses (Boudou et al., 2010; Detzel, Larkins et Rajagopalan, 2011; Hammond, 2011; Richert et al., 2004). Finalement, le mode de croissance exponentiel peut être problématique lorsque la conception d'un film requiert plusieurs groupes de couches ayant des fonctions distinctes (Hammond, 2011).

1.3.4.3 Mécanismes de relargage

Un avantage important des films LbL réside dans leur capacité à immobiliser une quantité importante de molécules, comme les facteurs de croissance, tout en préservant leur bioactivité (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012). Les films LbL peuvent ainsi répondre à l'une des principales problématiques concernant l'administration de facteur de croissance, qui est le relargage non-contrôlé résultant en une concentration initiale élevée suivie d'une

élimination rapide, ce qui limite les effets thérapeutiques possibles (Detzel, Larkins et Rajagopalan, 2011). Les films LbL peuvent donc permettre l'immobilisation et un relargage efficace dans le temps de facteurs de croissance (Go et al., 2011; Macdonald et al., 2010; Shah et al., 2011; Ye et al., 2013) selon plusieurs mécanismes (Figure 1.7): la diffusion, la dégradation du film ou la dégradation déclenchée par un stimulus chimique (Pavlukhina et Sukhishvili, 2011).

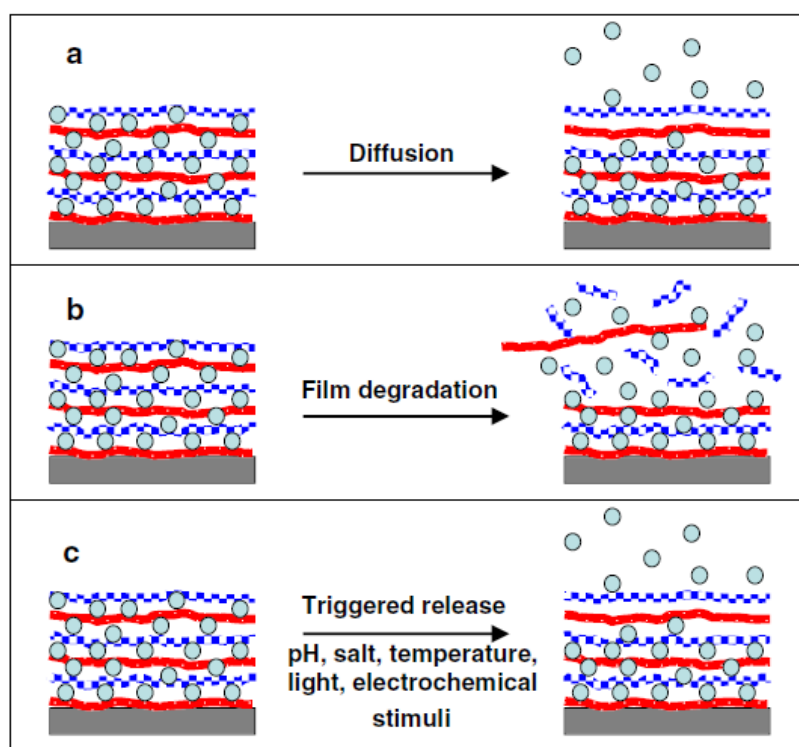


Figure 1.7 Les trois mécanismes principaux de relargage par film LbL : (a) la diffusion, (b) la dégradation et (c) le relargage déclenché par un stimulus chimique
Tirée de (Pavlukhina et Sukhishvili, 2011)

Le mécanisme par diffusion (Figure 1.7 a) est souvent caractérisé par un relargage rapide des molécules. Il a lieu surtout avec l'utilisation d'agents bioactifs de faible poids moléculaire. Ainsi, le temps de relargage avec un mécanisme de diffusion est peu influencé par les propriétés et la stabilité du film, mais peut toutefois être favorisé si les couches encapsulant les molécules de relargage ont une porosité élevée.

Le mécanisme de relargage par la dégradation du film (Figure 1.7 b) est quant à lui directement influencé par les propriétés du film telles que la densité de charge des composants, la stabilité du film ainsi que son caractère hydrophobe. Pour des applications biomédicales, les films LbL faits à partir de molécules biologiques sont souvent dégradés par hydrolyse suite à l'activité enzymatique cellulaire. Ce type de relargage peut aussi être accompli en intégrant des molécules hydrolysables à un pH physiologique tel que les poly β aminoesters (Macdonald et al., 2011).

Le relargage déclenché par stimulus chimique (Figure 1.7 c) est le mécanisme le plus complexe. Ces films sont entre autre utilisés dans la fabrication de capsules pour les médicaments et permettent, par exemple, d'augmenter drastiquement la porosité de la capsule lorsqu'en contact avec des conditions spécifiques pour permettre la libération des agents bioactifs qu'elle contient.

Il est possible que plusieurs mécanismes de relargage participent au relâchement des molécules bioactives d'un même film. Par exemple, dans le cas d'un profil de relargage tel que celui de la Figure 1.8, il est probable que le relargage effectué entre les jours 0 et 2, qui correspond à la pente la plus élevée de la courbe, soit le résultat d'un relargage par diffusion tandis que le relargage effectué les jours subséquents ait été le résultat de l'hydrolyse du film.

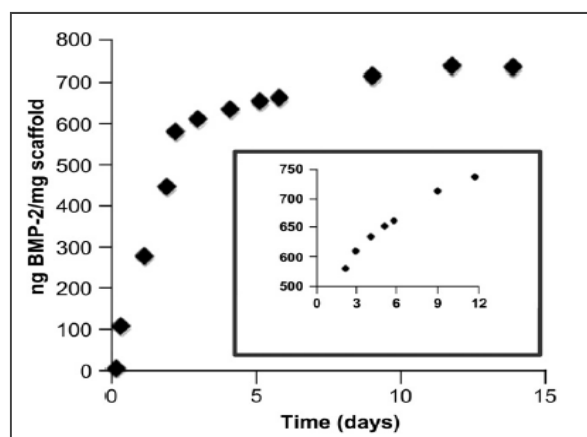


Figure 1.8 Exemple d'un profil de relargage
Tirée de (Macdonald et al., 2011)

1.4 Biomimétisme

Un revêtement biomimétique est défini comme étant un film structurellement ou chimiquement semblable à une composante de tissus et conçu pour générer une réponse spécifique de l'hôte grâce à ses propriétés naturelles (Williams, 1999). Le développement de biomatériaux possédant de telles propriétés nécessite donc une bonne compréhension de la structure et de la composition des tissus visés ainsi que des mécanismes de guérison vasculaire (détaillée à la section 1.1.4 – Mécanismes de guérison vasculaire).

De manière générale, les tissus sont un amalgame de cellules incorporées dans une matrice appelée matrice extracellulaire (MEC). Elle est composée de protéines structurales, de polysaccharides et de molécules bioactives tel que les facteurs de croissance, qui sont relâchées sur demande (Alberts et al., 1994; Wenk et al., 2010). La MEC est la principale composante du tissu conjonctif et ses constituants sont sécrétés par les cellules locales, soit les fibroblastes et les cellules musculaires lisses dans le cas des vaisseaux sanguins. Sa principale fonction est de réguler les différents comportements cellulaires en interagissant avec les récepteurs transmembranaires des cellules, principalement les intégrines (Alberts et al., 1994), afin d'induire de manière spécifique au tissu, la migration, la prolifération, la différenciation et la communication inter cellule (Rahmany et Van Dyke, 2013) (Figure 1.9). La MEC procure donc aux cellules un support mécanique ainsi que des signaux biochimiques dont elles ont besoin pour leur bon fonctionnement (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012; Lutolf et Hubbell, 2005).

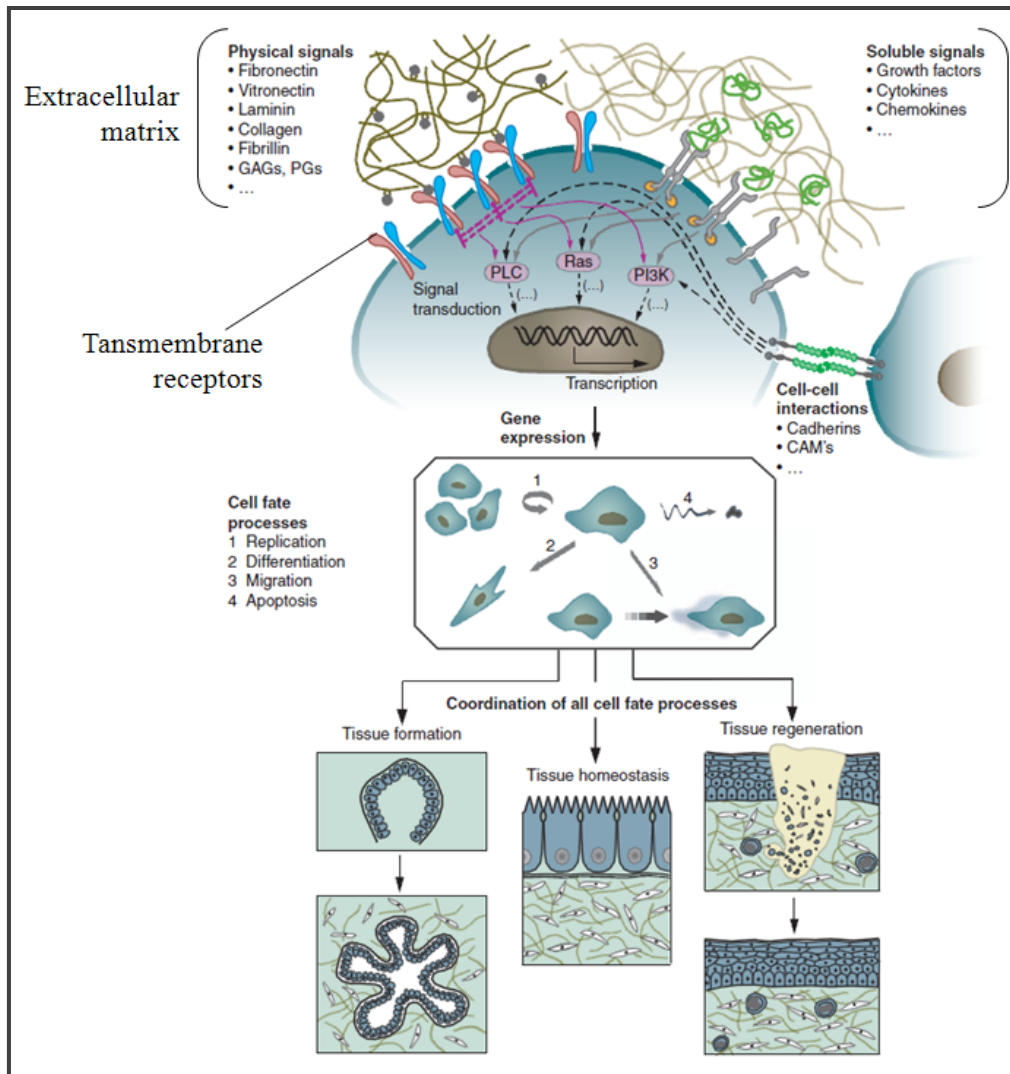


Figure 1.9 Schématisation des interactions entre la MEC et les cellules
Adaptée de (Lutolf et Hubbell, 2005)

1.4.1 Le biomimétisme par LbL

Rahmany et col. ont recensés trois stratégies dans le développement de biomatériaux aux propriétés biomimétiques : 1) l'incorporation et le relargage de molécules bioactives; 2) la modification de surface à l'aide de molécules bioadhésives de la matrice extracellulaire (MEC); 3) la création de nanomotifs sur le matériau (Rahmany et Van Dyke, 2013). Grâce à son caractère versatile, la technique du LbL a entre autre été utilisée à plusieurs reprises, mais

pour d'autres applications, dans la fabrication de revêtement pour biomatériaux aux fins de ces trois stratégies, particulièrement les stratégies 1 et 2.

Par exemple, le LbL a été utilisé à plusieurs occasions afin de reproduire, de manière générale, un environnement semblable à la matrice extracellulaire (Brynda et al., 2005; Costa et al., 2011; Itoh et al., 2008; Oliveira et al., 2013; Sailer et al., 2012; Volpato et al., 2012). Plusieurs types de revêtements LbL pour des applications orthopédiques ont été développés afin de favoriser l'intégration osseuse des implants en alliage de titane à l'aide du relargage de molécules favorisant l'adhésion et la prolifération de certains types de cellules osseuses (Basmanav, Kose et Hasirci, 2008; Crouzier et al., 2009; Macdonald et al., 2010; Shah et al., 2011). Le LbL a aussi été utilisé dans la création de films favorisant l'endothélialisation d'implants vasculaires tel que les stents (Lin et al., 2010; Meng et al., 2009), les endoprothèses couvertes pour les vaisseaux de petit calibre (Boura et al., 2003; Liu, He et Gao, 2005; Liu et al., 2007) ou les valves aortiques (Ye et al., 2013) pour améliorer la compatibilité avec le sang. Les revêtements LbL sont actuellement explorés pour la régénération des tissus biologiques peu vascularisés tels que les cartilages (Gong et al., 2007; He, Wang et Wu, 2012; Silva et al., 2013) et les disques intervertébraux (Liang et al., 2012).

Dans le cas des EC, tel qu'exposé plus tôt, l'objectif principal d'un revêtement LbL serait de favoriser la guérison des vaisseaux sanguins autour de l'implant. En se basant sur une approche biomimétique et en considérant le fait que la MEC joue un rôle de premier plan dans le processus de guérison, les substances choisies pour la fabrication du revêtement respecteraient logiquement les critères suivants :

- 1) Elles sont des molécules biologiques et possèdent des propriétés semblables aux composantes de la MEC
- 2) Elles ont la capacité de former des films LbL (i.e. elles peuvent être chargées lorsqu'elles sont placées dans les conditions appropriées selon leur pKa, pKb ou PI)

- 3) Elles ont des propriétés qui pourraient faciliter la guérison des vaisseaux sanguins et/ou favoriser la survie et/ou l'adhésion et la prolifération des VSMCs qui jouent un rôle de premier plan dans la guérison des vaisseaux sanguins.

À cet effet, certaines substances qui correspondent aux critères établis ici ont été ciblées: le collagène (COL), le sulfate de chondroïtine (CS), un facteur de croissance (le bFGF) et le chitosane (CHI). Les détails quant aux propriétés justifiant la sélection de ces substances sont exposés ci-après.

1.4.1.1 Collagène

Le COL est une famille de protéines structurales que l'on retrouve chez tous les animaux multicellulaires. Elle constitue environ 30% des protéines contenues dans le corps humain et est retrouvée principalement dans la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs (Brodsky, 2012). Il existe plus de 27 types de collagène qui sont associés à des types de tissus particuliers (Brickmann, Notbohm et Müller, 2005). Toutefois, 90% du collagène contenu dans le corps humain est de type I (Alberts et al., 1994) (Figure 1.10).

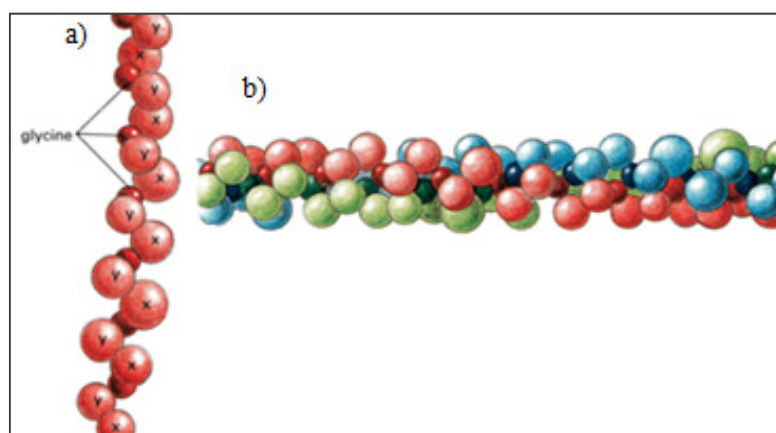


Figure 1.10 Une molécule typique de collagène composée de trois chaînes de polypeptide (chaînes α) (a) assemblées dans une structure hélicoïdale (b)
Adaptée de (Alberts et al., 1994)

Le collagène est une protéine structurelle qui joue un rôle de premier plan dans plusieurs mécanismes biologiques essentiels à la vie. Il permet de conserver l'intégrité des tissus et de leur conférer une certaine résistance mécanique (Brodsky, 2012). De plus, il interagit avec les cellules par l'entremise des intégrines (récepteurs) afin d'en réguler l'adhésion et la migration (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012; White et al., 2004). Enfin, ses propriétés hémostatiques favorisent la coagulation du sang et en font un élément essentiel à la guérison des tissus.

Le collagène est déjà largement utilisé dans le domaine biomédical étant donné les nombreux avantages qu'il comporte : biocompatibilité, biodégradabilité, non-antigénicité, propriétés hémostatiques, etc. (Lee, Singla et Lee, 2001).

Dans le contexte du LbL, le COL déjà été utilisé à plusieurs reprises pour la fabrication de films pour des applications biomédicales (Chaubaroux et al., 2012; He, Wang et Wu, 2012; Mhanna, Voros et Zenobi-Wong, 2011; Zhang et al., 2005). Il peut être utilisé comme un polyanion ou un polycation étant donné qu'il possède un PI $\sim 5,5$ (Luescher, M.; Rueg, M.; Schindler, P. *Biopolymers* 1997, 13, 2489–2503). Il portera à la fois des groupements chargés positivement et négativement ce qui en fait un polyélectrolyte faible. Dans le cas de l'application dont il est ici question, les propriétés pro-adhésives du collagène seront exploitées afin de principalement favoriser l'adhésion des VSMC sur les surfaces LbL.

1.4.1.2 bFGF

Un facteur de croissance est une protéine biologiquement active et hautement spécifique stimulant certains types de cellules à croître, proliférer et se différencier (Alberts et al., 1994; Bothwell, 2012). Ils sont présents dans le sérum et, dans la plupart des cas, ne sont nécessaires qu'en très faibles concentrations ($\sim 10^{-9} - 10^{-11}$ M). C'est d'ailleurs pour cette raison qu'ils sont difficiles à isoler et donc très coûteux (Alberts et al., 1994).

Les principaux facteurs de croissance impliqués dans la guérison des vaisseaux sanguins sont le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), le facteur de croissance transformant beta (TGF- β), le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) ainsi que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Barrientos et al., 2008). Plusieurs études ont démontré que le relargage de bFGF pouvait favoriser la formation de tissus organisés ce qui justifie son choix dans le contexte présent (Kajimoto et al., 2008; Kusanagi et al., 2007; van der Bas et al., 2002; van der Bas et al., 2004).

Le bFGF (18kDa (Delrieu, 2000)) fait partie d'une famille d'au moins 7 facteurs de croissance et il stimule entre autre la prolifération et la migration des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses ainsi que des fibroblastes lors du processus de guérison des vaisseaux sanguins (Kusanagi et al., 2007; Pearlman et Wang, 1996; Wenk et al., 2010).

En solution, le bFGF possède une demi-vie de 1,5 minute (Volpato et al., 2012). Il est toutefois possible d'augmenter considérablement la stabilité de cette protéine en l'immobilisant de façon adéquate. Le bFGF possède une forte affinité pour la molécule d'héparine qui fait partie des glycosaminoglycans présents dans la matrice extracellulaire. Le nombre de groupements sulfates et carboxyles présents sur une molécule paraît directement affecter la capacité du bFGF à se stabiliser (Matsusaki et al., 2005; Mi et al., 2006; Yayon et al., 1991). Ainsi, bien que l'héparine semble être la molécule la plus performante au niveau de la préservation de ce facteur de croissance, d'autres glycosaminoglycans sulfatés tel que le sulfate de chondroïtine ou l'héparane sulfate peuvent aussi parvenir à stabiliser le bFGF (Matsusaki et al., 2005; Mi et al., 2006).

La particularité dans l'utilisation du bFGF pour la fabrication d'un film LbL, mis à part les conditions d'immobilisation qu'il requiert pour la conservation de sa bioactivité, réside dans la nécessité d'avoir une concentration optimisée afin d'avoir un impact maximisé sur les cellules visées. En effet, il a été observé plusieurs fois que le bFGF induit une réponse mitogénique plus importante à des doses intermédiaires qu'à des doses élevées (Jeon et al., 2006).

Le bFGF possède un PI à un pH de 9,6 (Almodovar et al., 2010; Pearlman et Wang, 1996) ce qui fait en sorte que dans un contexte de LbL, il est souvent utilisé en tant que polycation. Il a d'ailleurs été utilisé à plusieurs reprises dans la fabrication de films LbL pour des applications biomédicales (Itoh et al., 2008; Ma et al., 2007; Macdonald et al., 2010; Mi et al., 2006; She et al., 2012). Dans le cas du LbL développé dans le cadre de ce projet, le bFGF sera utilisé afin d'améliorer la survie et la prolifération des VSMC.

1.4.1.3 Sulfate de chondroïtine

Le CS (Figure 1.11) est une molécule de la famille des glycosaminoglycanes (GAG) et est abondamment présente dans la matrice extracellulaire.

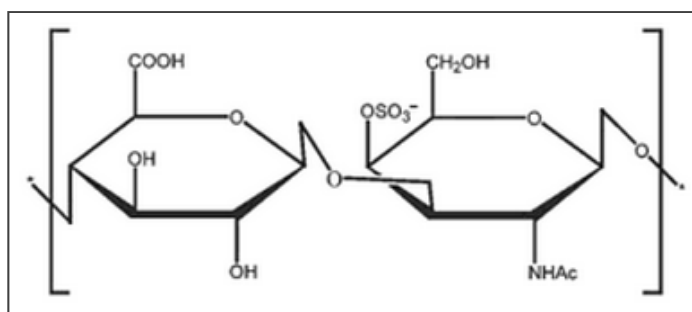


Figure 1.11 Structure du sulfate de chondroïtine A
Tirée de (Volpi, 2006) p.72

Il a été démontré qu'il favorise la guérison des tissus en améliorant la migration cellulaire et en stimulant la prolifération des fibroblastes ainsi que la production de fibronectine (Hinek, Boyle et Rabinovitch, 1992; Zou et al., 2009). En plus de permettre une immobilisation adéquate du bFGF, il a été suggéré que le CS a la capacité d'amplifier le caractère mitogénique de ce facteur de croissance (Nikitovic et al., 2007). Cette substance est aussi reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires (Macdonald et al., 2010) et anti-apoptotiques chez les fibroblastes et les VSMC (Laplante et al., 2005; Raymond et al., 2004). Elle possède la capacité d'inhiber l'apoptose en favorisant l'expression d'un médiateur anti-apoptotique chez les VSMC, soit la protéine Bcl-xl (Raymond et al., 2004). Ainsi, il a été

démontré que la CS en solution ou immobilisée de manière covalente possède des propriétés anti-apoptotiques chez les VSMC (Charbonneau et al., 2011; Charbonneau et al., 2012; Raymond et al., 2004). De plus, le CS est une substance relativement stable d'un point de vue thermique et chimique. Elle possède toutefois un effet anti-coagulant qui pourrait nuire au processus de guérison du vaisseau.

Le CS a un pKa à un pH ~ 2 (Park et Na, 2009). Ainsi dans un contexte de LbL, il sera généralement utilisé comme un polyanion et est considéré comme un polyélectrolyte fort. Il a d'ailleurs été utilisé à mainte reprise à cet effet (Denuzziere, Ferrier et Domard, 1996; Gong et al., 2007; Liu, He et Gao, 2005; Macdonald et al., 2011; Mhanna, Voros et Zenobi-Wong, 2011; Mi et al., 2006). Dans le cas présent, le CS sera donc principalement utilisé pour l'immobilisation du bFGF et, lorsque relargué, pour ses propriétés antiapoptotiques.

1.4.1.4 Chitosane

Le CHI (Figure 1.12) est un polysaccharide produit par désacétylation² de la chitine qui est extraite de la carapace de crustacés tel que crabes et crevettes (Pavinatto, Caseli et Oliveira, 2010). La chitine est synthétisée par de nombreux organismes vivants et, considérant la quantité produite annuellement, est le polymère le plus abondant sur terre après la cellulose (Rinaudo, 2006) ce qui en fait une matière première peu coûteuse (Dutta, Dutta et Tripathi, 2004).

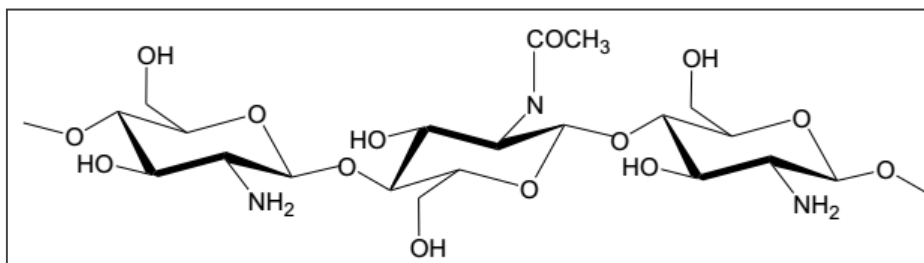


Figure 1.12 Structure du chitosane

² Substitution d'un groupement acétyle ($\text{CH}_3\text{-CO-}$) par un atome d'hydrogène dans une molécule

Le CHI est une substance biocompatible, biodégradable, non-toxique, antimicrobienne et qui n'induit pas de réponse immunitaire (Cima et al., 1991; Dutta, Dutta et Tripathi, 2004; Jayakumar et al., 2011; Meng et al., 2009). Il est d'ailleurs abondamment utilisé dans plusieurs domaines biomédicaux tels que les pansements et la fabrication de systèmes de relargage de médicaments (Khor et Lim, 2003). Le CHI est reconnu entre autre pour améliorer le processus de guérison des plaies par le phénomène d'angiogénèse³. Ainsi, il stimule la production de certains types de facteurs de croissance (TGF-1 et PDGF) et d'interleukines⁴ (leukotriene B4, Il-1 and Il-8) (Boddohi et Kipper, 2010).

Étant donné ses groupements amines, le CHI est utilisé comme un polycation ($PK_a \sim 6$) (Rinaudo, 2006) et sa densité de charge est élevée (Costa et al., 2011; Liu, He et Gao, 2005). Il a d'ailleurs été utilisé à de nombreuses reprises pour la fabrication de films LbL pour des applications biomédicales (Almodovar et al., 2011; Fu et al., 2005; Hu et al., 2012; Itoh et al., 2008; Liu, He et Gao, 2005; Meng et al., 2009; Silva et al., 2013) ainsi qu'à des fins d'étude de caractérisation de films LbL à base de polymères biologiques (Almodovar et al., 2011; Boddohi, Killingsworth et Kipper, 2008; Boudou et al., 2009; Kujawa et al., 2005; Lundin et al., 2011). Dans le contexte présent, le CHI sera principalement utilisé pour ses propriétés de polyélectrolytes forts qui permettront l'adsorption d'une grande quantité de polyélectrolytes lors de la construction du film LbL.

³ Processus de formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins existants

⁴ Les interleukines sont un type de cytokines qui permettent la communication intercellulaire

CHAPITRE 2

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'objectif global de ce projet consiste à concevoir un revêtement de type LbL permettant de favoriser l'adhésion, la prolifération et la migration des VSMC sur et à proximité des EC afin d'améliorer la fixation par la guérison du vaisseau sanguin et de limiter la progression de l'anévrisme pour ainsi améliorer les résultats cliniques après la pose d'une endoprothèse couverte (EC). À cet effet, les molécules d'intérêt ont été identifiées comme étant le bFGF, le CS, le COL ainsi que le CHI et elles seront étudiées dans le cadre de la fabrication d'un film LbL afin de remplir les objectifs spécifiques décrits ci-dessous :

- A. Démontrer la capacité de produire un revêtement de type LbL à l'aide de substances d'intérêt pour l'amélioration de la guérison des vaisseaux sanguins tel que présenté dans la section revue de littérature.
- B. Démontrer la capacité à produire un film LbL sur un substrat L-PPE:N pour prouver la versatilité de la technique. Le revêtement pourrait ainsi être facilement transférable sur une endoprothèse couverte (EC) ou sur une variété de substrat.
- C. Démontrer la capacité du film à relarguer une quantité appréciable de facteurs de croissance afin d'assurer la possibilité d'un effet thérapeutique du revêtement.
- D. Démontrer *in vitro* la capacité du film à améliorer l'adhésion, la croissance et la survie des VSMC

Il est à noter que le présent projet constitue une preuve de concept pour un revêtement dont l'objectif ultime est l'amélioration de la performance biologique des EC. Ainsi, les objectifs spécifiques posés ci-haut reposent sur certaines hypothèses qui ont été émises à

la lumière de la revue de littérature, mais qui ne seront toutefois pas vérifiées dans le cadre de ce projet:

- La migration, l'adhésion et la prolifération de VSMC provenant de la paroi du vaisseau favoriseraient la production d'une matrice extracellulaire et la guérison tissulaire autour de l'implant.
- Cette guérison aurait pour effet de réduire les risques de complications cliniques après EVAR.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Conception d'un revêtement LbL

Le revêtement conçu pour remplir les objectifs cités dans la section *objectifs et hypothèses* (page 33) est schématisé à la Figure 3.1.

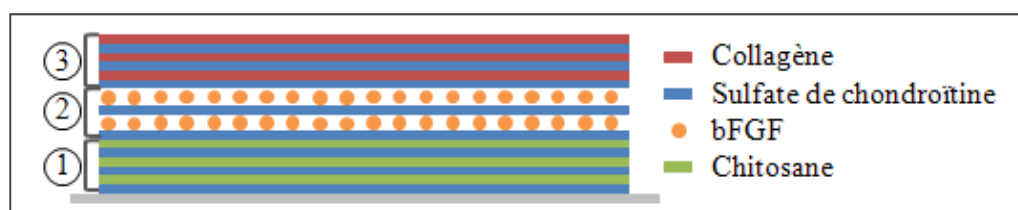


Figure 3.1 Composition du LbL [CS/CHI]₃ - [CS/bFGF]₂ – [CS/COL]₃

La première partie du revêtement (Figure 3.1, section 1) est constituée de couches qui serviront principalement à la fabrication adéquate des couches subséquentes (Figure 3.1, section 2 et 3). En effet, des couches de base peuvent être nécessaires pour permettre l'adsorption LbL de couples de molécules dont la différence de poids moléculaire et de densité de charge est significative, tel que pour le couple CS/bFGF. Les couches de base permettront principalement de s'assurer que le substrat est entièrement couvert de polyélectrolytes de façon à ce qu'un maximum de groupements chargés soit disponible pour la fabrication des couches suivantes (Macdonald et al., 2010). Elles permettront ainsi d'intégrer une plus grande quantité de bFGF dans le film (Figure 3.1, section 2). Le CHI et le CS ont été choisis pour ces couches non seulement pour les raisons énoncées précédemment (section 1.4.1), mais aussi parce qu'ils sont des polyélectrolytes forts et qu'ils risquent de permettre meilleure adsorption des couches subséquentes que des polyélectrolytes faibles comme le COL. Ainsi, la combinaison CS/CHI semble appropriée pour remplir les fonctions ci-énoncées.

La seconde partie du revêtement (Figure 3.1, section 2) constitue le réservoir de facteurs de croissance. Tel que mentionné dans la section revue de littérature (section 1.4.1), les groupements sulfate du CS permettront d'immobiliser efficacement le bFGF tout en préservant sa bioactivité. Ainsi, ces couches seront formées non seulement par les liens électrostatiques qui interviennent traditionnellement dans la fabrication des films LbL, mais aussi par des interactions spécifiques entre le facteur de croissance et le CS.

La troisième partie du revêtement (Figure 3.1, section 3) a, quant à elle, deux fonctions. Tout d'abord, le COL qu'il contient permettra de stimuler l'adhésion cellulaire. Ensuite, comme le bFGF est une protéine de faible poids moléculaire, il est probable que le relargage soit principalement effectué par un mécanisme de diffusion, surtout au début du processus. Ce phénomène a été observé plusieurs fois pour des films LbL contenant des facteurs de croissance (Ma et al., 2007; Macdonald et al., 2011). Ainsi, afin de limiter ce phénomène et d'uniformiser le taux de relargage dans le temps, les couches CS/COL serviront aussi à limiter la diffusion du facteur de croissance hors du film en agissant comme couches de rétention (Go et al., 2011) à travers lesquelles le bFGF devra se faufiler pour se libérer du film.

Afin de générer ce film LbL sur une surface, il est essentiel que celle-ci soit chargée. Ainsi, l'un des objectifs de ce projet consiste à vérifier la faisabilité de construire un tel film LbL sur un revêtement plasma de type L-PP E :N, tel que présenté dans la section *Polymérisation plasma* de la revue de littérature (section 1.2.2.1). Ceci permettra de transférer le film LbL sur une EC ou sur une grande variété de substrats, ce qui lui conférerait un caractère versatile.

3.2 Développement des films LbL

Pour des raisons de coûts liés à l'utilisation du bFGF et du COL, les sous-objectifs fixés (page 33) ont été validés grâce à plusieurs revêtements intermédiaires qui ont chacun été caractérisés grâce à différentes techniques :

1. [CS/CHI]
2. [CS/COL]
3. [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂
4. [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃

La Figure 3.2 présente un résumé de la démarche de caractérisation et de validation des sous-objectifs.

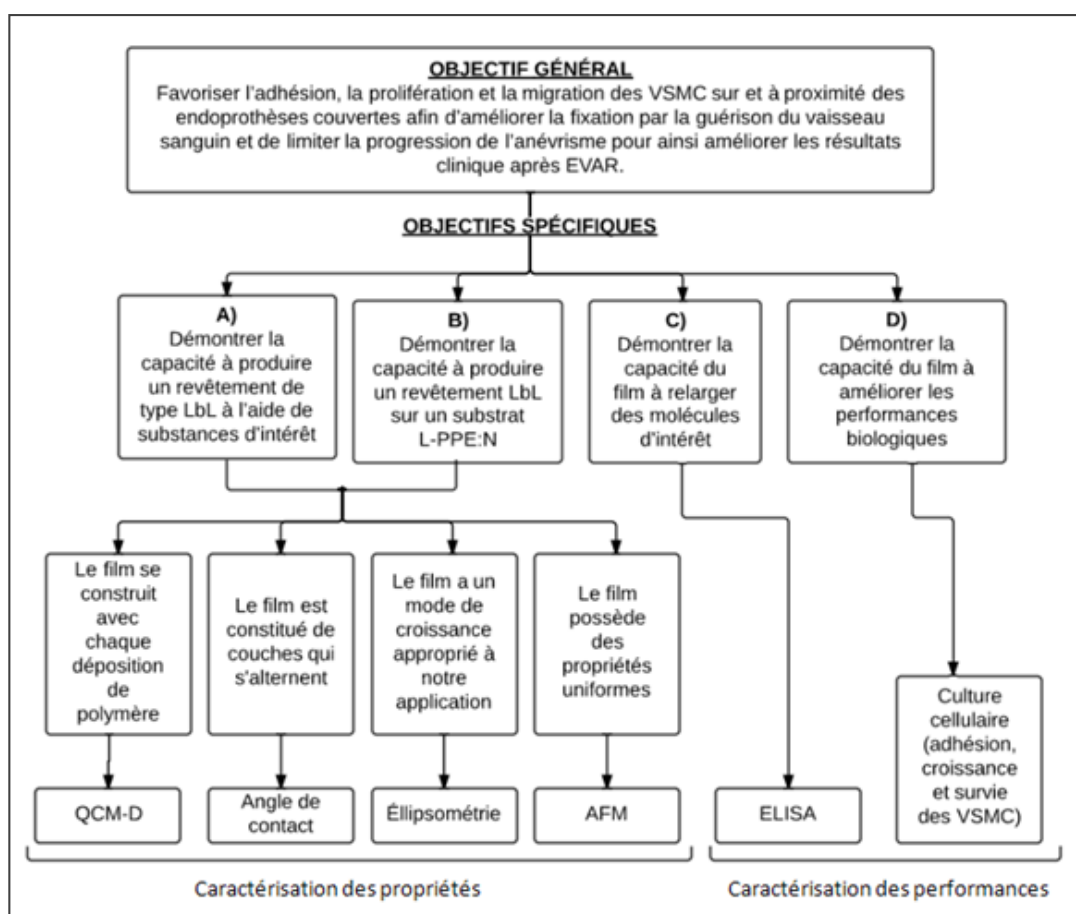


Figure 3.2 Techniques de caractérisation utilisées pour la validation des objectifs spécifiques fixés

Tout d'abord, afin de valider l'objectif spécifique B, une preuve de concept de la construction d'un film LbL [CS/CHI] est effectuée sur un substrat de L-PPE :N. Ensuite, sauf lorsque spécifié, à des fins de simplification, les sous-objectifs A, C et D sont validés sur des substrats de verre aminé (aminosilane coated im glass, Fisher scientific, Fair Lawn, États-

Unis). Comme ce type de substrat est issu d'un processus normalisé, il est raisonnable d'affirmer que la nature et la densité de charge du substrat sont les mêmes pour tous les échantillons. Ainsi, les objectifs A et D sont validés à l'aide des films [CS/CHI] et [CS/COL]. Finalement, l'objectif C est validé à l'aide de revêtements [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂ et [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃ afin de comparer les cinétiques de libération du bFGF.

3.3 Paramètres de fabrication des films LbL

3.3.1 Préparation des substrats

Nettoyage

Les substrats sont découpés en échantillons ~10 X 10 mm, identifiés et nettoyés par sonication dans une solution d'éthanol 70% (Alcool éthylique anhydre, Commercial alcohols, Brampton, Canada) puis dans l'eau MilliQ (10 minutes pour chaque bain). Ils sont séchés par un jet d'azote (Azote comprimé, Praxair, Mississauga, Canada) et placés dans un contenant scellé jusqu'à utilisation.

Polymérisation plasma

Les revêtements L-PPE :N sont fabriqués à l'aide d'un réacteur de décharge lumineuse de radiofréquence (Figure 3.3) dans lequel est introduit un mélange gazeux d'ammoniaque (NH₃) et d'éthylène (C₂H₄) avec un ratio 3 :4 (Ruiz et al., 2010) à basse pression. Un plasma froid est ensuite créé entre l'électrode et les parois de la chambre de dépôt (mise à la terre) grâce à la source de radiofréquences (r.f.), ce qui permet le processus de polymérisation des gaz et produit le revêtement L-PPE :N.

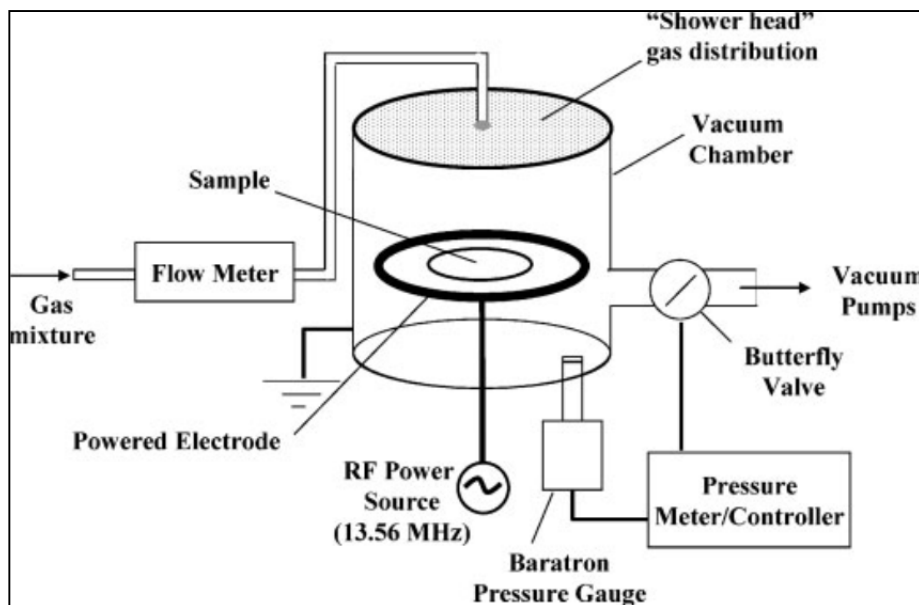


Figure 3.3 Réacteur de décharge lumineuse de radiofréquence
utilisé dans la fabrication du L-PPE :N
Tirée de (Truica-Marasescu et Wertheimer, 2008)

Pour effectuer les dépôts L-PPE :N, les échantillons sont déposés dans la chambre cylindrique du réacteur plasma ($\sim 650 \text{ cm}^3$) (Figure 3.3). Une pompe turbo-moléculaire permet d'atteindre un vide de l'ordre de $>10^{-4} \text{ Pa}$ (pour éviter les contaminations) puis les gaz NH_3 et C_2H_4 sont injectés dans la chambre avec un débit de $15 \text{ cm}^3/\text{min}$ pour NH_3 et de $20 \text{ cm}^3/\text{min}$ pour C_2H_4 (ratio 3 :4). Ce ratio des gaz a été choisi, car il constitue le meilleur compromis entre la concentration d'amines primaires et la stabilité (dans l'air et dans l'eau) du revêtement L-PPE :N (Ruiz et al., 2010). Lorsque la pression à l'intérieure de la chambre atteint 80 Pa , la source de radio fréquence est mise en marche avec une puissance de 10 W et le dépôt de polymères s'effectue pendant 8 minutes, de façon à obtenir un revêtement d'une épaisseur d'environ 100 nm .

3.3.2 Préparation des revêtements LbL

Sauf lorsque spécifié, les revêtements sont préparés de la manière suivante :

- 24h avant la fabrication des films LbL, les solutions de polymère et de rinçage sont préparées tel qu'exposé dans le Tableau 3.1 puis filtrées à 0,20 μm (0,20 μm sterile syringe filter, Corning inc., New York, États-Unis). Les solutions sont ensuite placées dans des tubes propres, scellés et réfrigérés. Les solutions sont amenées à température ambiante avant utilisation.
- Le substrat approprié est préparé tel que spécifié dans la section précédente. (Préparation des substrats, page 38)
- Les couches LbL sont déposées à l'aide de bains de 20 minutes dans les solutions de polyélectrolytes et chaque dépôt est intercalé par un rinçage d'au moins 10 minutes.
- Lorsque le nombre de couches désiré est atteint, les échantillons sont séchés à l'azote et conservés dans une plaque 24 puits ou un pétris scellée en attendant d'être utilisés (généralement le jour même ou le lendemain lorsque nécessaire).

Tableau 3.1 Composition des solutions de polymère

Type de Solution		Préparation
Solutions de Polymères	CS	0.5mg/ml de CS (Sulfate de chondroïtine A sel de sodium de traché de bovin, Sigma-aldrich Canada Ltd., Oakville, Canada) (pKa ~ 2) solubilisé dans une solution de 0.15M de NaCl (Chlorure de sodium, Fisher scientific, Fair Lawn, États-Unis).
	CHI	0.5mg/ml de CHI (pKa ~ 6) (Kitomer, Mw 250 kDa, DDA 94%, Marinard Biotech, Rivière-au-Renard, Canada) purifié au laboratoire est solubilisé dans une solution de 0.15M de NaCl et 0.01M HCl (Acide Hydrochlorique, Fisher scientific, Fair Lawn, États-Unis). Le pH est ensuite ajusté à ~5 à l'aide d'une solution 0,5M de NaOH (Hydroxyde de sodium en pastilles, BDH chemicals, Toronto, Canada).
	COL	0.5mg/ml de COL (PI ~ 5,5) (Collagen type I, MP Biomedicals, Solon, États-Unis) est solubilisé dans une solution de 0.15M de NaCl et 0.1M d'acide acétique (Acide acétique glacial, ACP, Montréal, Canada).
	bFGF	Une solution de 5 µg/ml de bFGF (PI ~ 9,6) (FGF basique humain, Cedarlane, Burlington, Canada) est produite à partir d'une solution concentrée et diluée dans une solution <i>Phosphate buffered saline 1X</i> (PBS pH 7.4 10X, Gibco by life technologie, Burlington, Canada)
Solutions de rinçage	CS et CHI	0.15M NaCl
	COL	0.15M NaCl et 0.1M acide acétique
	bFGF	Solution PBS 1X

3.4 Caractérisation des revêtements

3.4.1 Caractérisation des propriétés physiques et chimiques

Les revêtements et leurs propriétés ont été caractérisés à l'aide de la microbalance à cristal de quartz avec module de dissipation (QCM-D), de l'angle de contact, de l'ellipsométrie et de

l'AFM. Cette partie de la caractérisation sert principalement à s'assurer que les revêtements LbL produits ont une configuration et une composition conforme à nos hypothèses et que le processus de fabrication est répétable.

3.4.1.1 QCM-D

Le QCM-D est une technique qui utilise les ondes acoustiques générées par l'oscillation d'un cristal de quartz afin de mesurer une masse à l'échelle du nanogramme. Dans le cas des revêtements LbL, le QCM-D permet d'étudier la formation du film en temps réel et de calculer la masse adsorbée par le revêtement après chaque étape de dépôt. Dans le cadre de ce travail, le système E4 (QCM-D, Q-sense, Stockholm, Suède) de la compagnie Q-Sense a été utilisé. Il contient 4 cellules de mesures permettant la fabrication d'autant surfaces en parallèle (Figure 3.4 a)

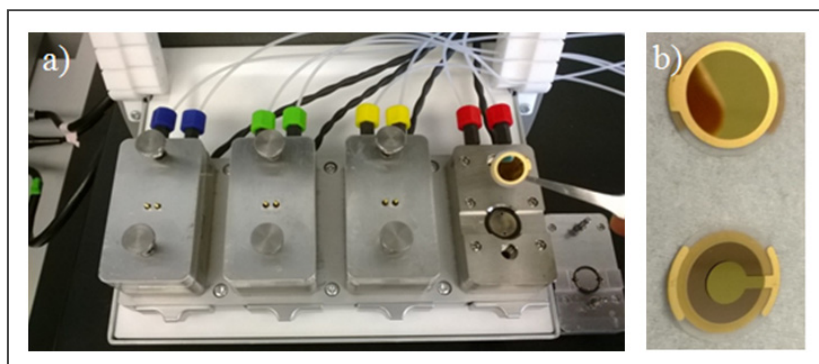


Figure 3.4 Le système E4 de Q-Sense (a) permet de suivre en temps réel la fabrication en parallèle de quatre surfaces sur ses capteurs (b)

Le principe de base repose essentiellement sur les propriétés piézoélectriques du quartz dont sont fabriqués les capteurs (Figure 3.4 b). Des électrodes d'or évaporées sur chaque face du cristal permettent d'appliquer un courant électrique alternatif qui le fait vibrer et permet d'atteindre sa fréquence de résonance qui est généralement de 5MHz pour un cristal d'une épaisseur de 330 μm (Figure 3.5) (Dixon, 2008; Höök et Kasemo, 2007; Leguen et al., 2007). Lorsqu'une masse se dépose sur un cristal de quartz, sa fréquence de résonance diminue et

vice versa; s'il y a une perte de masse, la fréquence augmente. Afin de prendre en considération la dépendance de la réponse QCM-D à la fréquence, celle-ci est typiquement mesurée pour les harmoniques impaires de 1 à 13.

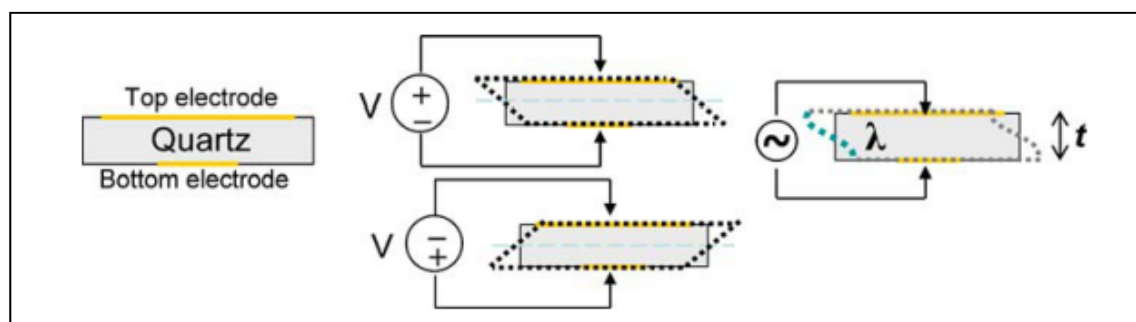


Figure 3.5 Schématisation du fonctionnement des capteurs de quartz QCM-D
Tirée de (Höök et Kasemo, 2007)

La relation de Sauerbrey (Équation 1) permet de lier linéairement les variations de fréquence (Δf) aux variations de masse (Δm).

Équation 1

$$\Delta m = \frac{C}{n} * \Delta f$$

Où $C = (t_q * \rho_q) / f_0$, m est la masse adsorbée, n représente l'harmonique, f est la fréquence et ρ_q et t_q , la densité et l'épaisseur du capteur de quartz.

Cette relation linéaire n'est toutefois valide que pour les masses adsorbées de façon rigide, ce qui n'est pas le cas pour beaucoup de films construits en milieu aqueux tel que les revêtements LbL. Leur caractère viscoélastique entraînera une perte dissipative due à la friction étant donné que la vibration de la masse adsorbée n'est pas parfaitement couplée avec celle du cristal de quartz. Ainsi, une prise de mesure de la dissipation de même que l'utilisation d'un modèle mathématique prenant en compte cette nouvelle variable dans la modélisation de la masse adsorbée devient nécessaire.

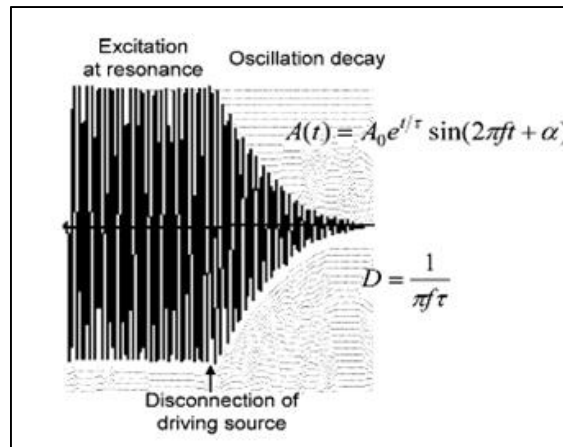


Figure 3.6 Schématisation du principe de mesure de la dissipation
Tirée de (Höök et Kasemo, 2007)

Afin de mesurer la dissipation du revêtement, le courant électrique transmis au cristal de quartz est périodiquement coupé et le voltage de sortie du capteur, dont l'oscillation décroît, est acquis (Figure 3.6). La dissipation est calculée à partir de ce signal. L'analyse des données est ensuite effectuée grâce au modèle mathématique de Voigt qui est caractérisé par son module d'élasticité complexe (Équation 2).

Équation 2

$$G_f = G'_f + iG''_f = \mu_f + i2\pi f \eta_f = \mu_f(1 + i2\pi f \tau)$$

Où G'_f est le module de conservation du film et G''_f est le module de perte du film; μ_f est le module élastique de cisaillement; η_f est la viscoélasticité du film et τ (η_f/μ_f) est le temps de relaxation caractéristique (Höök et Kasemo, 2007). Pour ce même modèle, les variations de fréquence et de dissipation pour une couche viscoélastique dans un milieu liquide peuvent être décrites selon l'Équation 3 et l'Équation 4 (Lundin et al., 2011).

Équation 3

$$\frac{\Delta f}{f} = - \frac{d_f \rho_f}{d_q \rho_q} \left(1 - \eta_0 \eta_0 * \frac{\left(\frac{\eta_f}{\rho_f}\right) \omega^2}{(\mu_f^2 + \omega^2 \eta_f^2)} \right)$$

Équation 4

$$\Delta D = \frac{d_f}{d_q \rho_q} \left(\eta_0 \rho_0 * \frac{\mu_f \omega}{\mu_f^2 + \omega^2 \eta_f^2} \right)$$

Où ω est la fréquence angulaire de l'oscillation ($\omega = 2 \pi f$), η_0 et ρ_0 sont respectivement la viscosité et la densité apparente, d_q et ρ_q sont l'épaisseur et la densité du capteur de quartz et d_f , ρ_f , η_f et μ_f sont respectivement l'épaisseur, la densité, la viscosité et le module de cisaillement du film.

Grâce à un algorithme de calcul implanté dans un logiciel d'analyse de données QCM-D (Q-Tools, Q-sense, Stockholm, Suède), il est possible d'estimer l'épaisseur, la viscosité ainsi que le module de cisaillement du film en fixant la valeur de certains paramètres tels que la densité et la viscosité du fluide ainsi que la densité du film. Pour les films LbL étudiés ici, la densité et la viscosité du fluide ont été fixées aux mêmes valeurs que l'eau soit 1 000 kg/m³ et 0,001kg/m·s respectivement et la densité du revêtement a été fixée à 1 200 kg/m³ (Lundin et al., 2011).

La Figure 3.7 présente un exemple de données brutes obtenues par QCM-D pour la fabrication d'un film LbL. Les données de dissipation et de fréquence pour la fabrication d'un tel revêtement se présentent typiquement sous forme d'escalier où chaque échelon correspond au dépôt d'une couche.

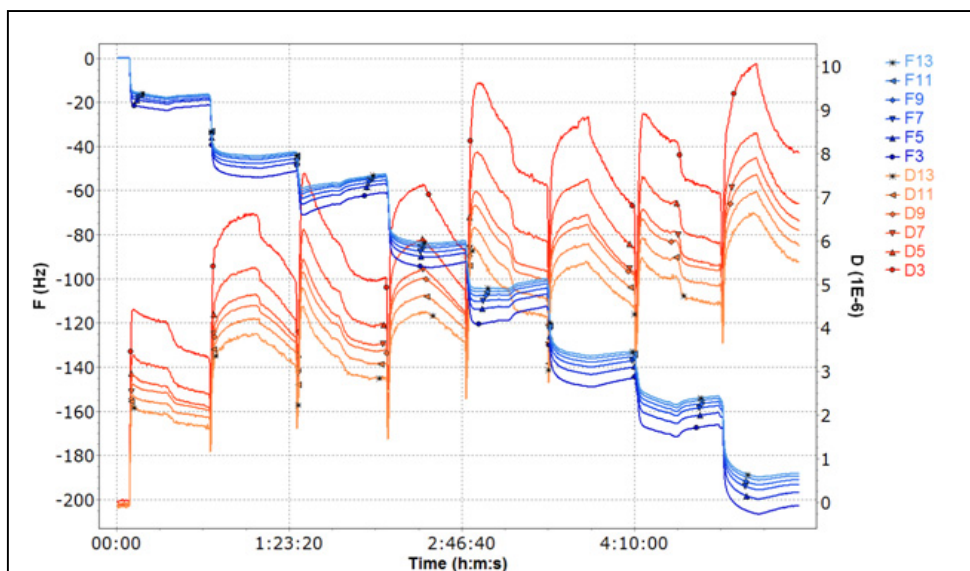


Figure 3.7 Valeurs de fréquence et de dissipation pour la construction d'un film [CS/CHI]. Les courbes bleues représentent la fréquence (F3 à F13) et les courbes oranges, la dissipation (D3 à D13) pour les harmoniques impaires de 3 à 13

Pour les films [CS/CHI] et [CS/COL], trois expériences QMC-D ont été effectuées à l'aide de 4 échantillons LbL par expérience. Les films sont fabriqués directement sur le capteur sauf dans le cas du film [CS/CHI] étudié sur L-PPE :N où un revêtement plasma est préalablement effectué sur les capteurs. Il est à noter qu'avec ce type de substrat, seulement 3 échantillons LbL sont produits pour chaque expérience étant donné que le 4^e capteur sert de contrôle : il est soumis à un flux d'eau MilliQ pendant toute la durée de l'expérience afin de s'assurer de la stabilité du revêtement plasma et que l'addition de masse constatée lors de la fabrication des films LbL n'est pas seulement due à l'absorption d'eau par le L-PPE :N. Dans le cas du film [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL], deux expériences préliminaires ont été effectuées pour mettre au point le revêtement puis il a été caractérisé à l'aide d'une expérience comportant la fabrication de 3 échantillons.

Pour réaliser ce type d'expérience, les capteurs et la tubulure de l'appareil sont nettoyés. Les capteurs sont ensuite placés dans leurs cellules puis l'appareil est calibré afin de déterminer de manière précise les harmoniques de chacun d'eux. La pompe péristaltique est mise en marche avec un flux de 50 μ l/minute. Les dépôts sont effectués en pompant les solutions de

polyélectrolyte et de rinçage à l'intérieur des cellules pendant 20 minutes pour chaque étape à l'exception des couches de bFGF qui sont effectuées pendant 40 minutes avec un flux de 5 $\mu\text{l}/\text{minute}$. À partir des données de fréquence et dissipation obtenues, l'épaisseur de chacune des couches déposées est calculée à l'aide du logiciel Q-Tools en utilisant le modèle viscoélastique de Voigt.

3.4.1.2 Angle de contact

L'angle de contact est une technique qui consiste à déposer une goutte d'un liquide, le plus souvent d'eau, sur une surface puis à mesurer l'angle (Figure 3.8, θ_c) entre celle-ci et une tangente aux extrémités du profil de la goutte. Le système formé par la goutte et la surface (Figure 3.8) contient trois principales interfaces: solide-liquide (γ_{SL}), liquide-vapeur (γ_{LV}) et solide-vapeur (γ_{SV}). Les tensions présentes aux interfaces sont directement responsables de la forme de la goutte déposée (Ratner et al., 2004; Slabaugh, 2012).

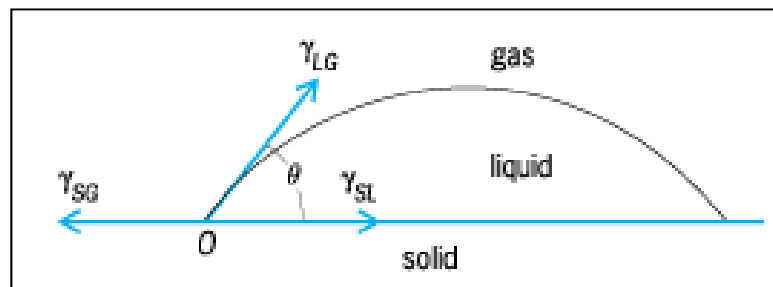


Figure 3.8 Schématisation d'une goutte pour la mesure d'angle de contact et des interfaces en présence
Tirée de (Slabaugh, 2012)

Dans des conditions statiques, la loi de Young Duprès (Équation 5) met en relation l'équilibre des forces en jeu et l'angle de contact (Temenoff et Mikos, 2008).

Équation 5

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG}\cos(\theta) = 0$$

Les mesures d'angle de contact servent généralement à fournir une information générale sur la mouillabilité d'une surface. En utilisant plusieurs liquides, on peut également évaluer l'énergie de surface (γ_{SG}) grâce à des modèles mathématiques mettant en lien les forces aux interfaces de la goutte et l'angle (Decker et al., 1999) comme les modèles de Newmann, Owen Wendt ou Good Van Oss.

L'angle de contact est largement utilisé dans le domaine des biomatériaux et constitue généralement une première étape de caractérisation étant donné son faible coût et la facilité d'utilisation. Toutefois, il est important de noter que cette technique ne peut fournir d'information sur la composition chimique et produit des valeurs dont la précision peut varier étant donné que les mesures peuvent être facilement affectées par de nombreuses sources de biais telles que la rugosité de la surface, les contaminations, la grosseur de la goutte déposée, la vitesse de la prise de mesure, etc. (Temenoff et Mikos, 2008).

Dans le cas des films multicouches, l'angle de contact permet de confirmer que le film produit est construit à la manière LbL et que les dépôts s'effectuent bien sous forme de couches définies. Comme les polymères utilisés possèdent souvent des hydrophobicités différentes, une mesure d'angle de contact sur la couche supérieure du film devrait permettre de déterminer si la nature de celle-ci change au fil des dépôts. Ainsi, les mesures prises après chaque déposition devraient s'alterner.

Les échantillons LbL destinés à la prise de mesure d'angle de contact sont fabriqués tel qu'exposé dans la section Paramètres de fabrication des films (page 38). Un échantillon par couche est fabriqué pour un total de 10 échantillons par expérience (par exemple, échantillon 1 : [CS], échantillon 2 : [CS/CHI], échantillon 3 : [CS/CHI]-CS, etc.). Les échantillons sont ensuite séchés pendant ~48h à 50°C (digital incubator, boeckel scientific, Feasterville, États-Unis). Juste avant la prise de mesure, le plateau de l'appareil d'angle de contact (VCA optima, AST products inc., Billerica, États-Unis) ainsi que la seringue (100µl technical syringe, Hamilton, Reno, États-Unis) sont nettoyés avec une solution d'éthanol 70%. La seringue est ensuite rincée 5 fois avec de l'eau MilliQ avant d'être installée sur l'appareil.

L'échantillon est soufflé avec un jet d'azote, une goutte d'eau MilliQ de $2\mu\text{l}$ est déposée à sa surface et l'angle de contact est mesuré après ~ 3 secondes. Trois mesures d'angle de contact sont prises pour chaque échantillon et chaque expérience a été répétée trois fois pour les films [CS/CHI], [CS/COL] ainsi que [CS/CHI] sur L-PPE :N.

3.4.1.3 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation optique qui permet de déterminer l'épaisseur de revêtements à couches minces de manière non-destructive. Le principe de base repose sur le changement de polarisation d'un faisceau de lumière lorsque celui-ci est transmis ou réfléchi à partir d'une surface. Concrètement, un faisceau de lumière est émis par la source et est polarisé de façon linéaire (Figure 3.9). Le faisceau passe à travers le compensateur avant d'atteindre l'échantillon. Il est ensuite réfléchi dans l'analyseur et le détecteur qui capteront le changement de polarisation du faisceau par rapport à son état initial qui est caractérisé par une différence d'amplitude et un changement de phase.

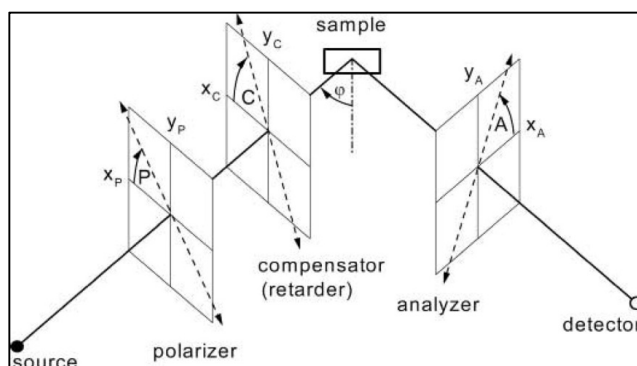


Figure 3.9 Configuration d'un ellipsomètre
Tirée de (Tompkins et Irene, 2005)

Ensuite, afin de calculer l'épaisseur du film, un modèle numérique de l'échantillon doit être posé en estimant certaines propriétés du film telles que l'indice de réfraction (n), l'épaisseur approximative, etc. Une simulation à partir des résultats obtenus peut alors être effectuée, puis les paramètres du modèle sont optimisés jusqu'à ce qu'ils concordent avec ce qui a été mesuré (Tompkins et Irene, 2005).

Dans le cas des expériences menées ici, des échantillons de gaufre de silicium sont tout d'abord soumis à un dépôt L-PPE :N tel que spécifié dans la section Paramètres de fabrication des films (page 38). Trois mesures d'ellipsométrie (RC2 ellipsometer, J.A. Woolam Co., inc, Lincoln, États-Unis) sont effectuées sur chacun d'eux. Les revêtements LbL sont ensuite effectués et les échantillons sont séchés à l'azote puis, trois mesures d'ellipsométrie sont effectuées à nouveau sur chaque échantillon.

3.4.1.4 AFM par contact intermittent

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique permettant d'imager la topographie d'une surface. Elle permet entre autre d'obtenir des informations sur la rugosité, l'uniformité de composition ainsi que la viscoélasticité de la surface lorsqu'en milieu liquide. L'AFM consiste grossièrement à balayer un échantillon à l'aide d'une pointe fine montée sur un support en porte à faux et de mesurer les déflexions de la pointe grâce à un système de laser et photodiode (Figure 3.10), ce qui permet d'imager la surface.

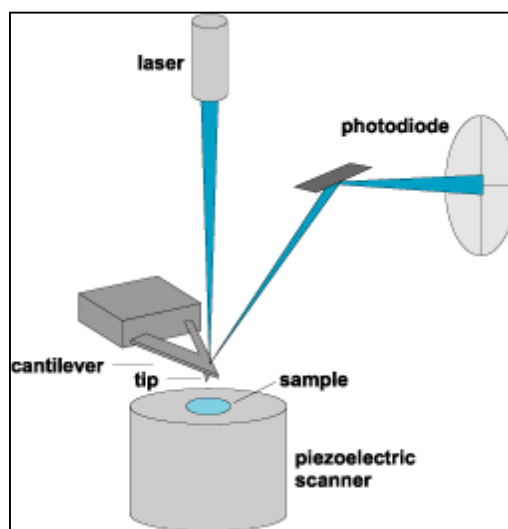


Figure 3.10 Configuration d'un
appareil AFM
Tirée de (Dufrêne, 2012)

Pour un balayage en mode contact intermittent, un élément piézoélectrique placé sur le portoir de la pointe lui confère une oscillation à une fréquence près de la résonance et à une

amplitude prédéterminée. La pointe est ensuite déplacée vers l'échantillon et, lorsque les deux éléments sont très près, des interactions physiques et/ou chimiques (interactions dipôle-dipôle, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, etc.) causeront une diminution de l'amplitude d'oscillation de la pointe. Pour pallier à ce changement, la hauteur de l'échantillon, qui est placé sur un portoir piézoélectrique, sera ajustée afin de maintenir constante l'amplitude d'oscillation initiale de la pointe. Cette opération est effectuée plusieurs fois par ligne de lecture afin de couvrir une zone prédéterminée. L'image topographique ainsi formée est en fait le résultat de nombreuses mesures prises par le contact intermittent de l'échantillon avec la pointe.

Les interactions entre la pointe et l'échantillon causeront aussi un changement dans la fréquence d'oscillation selon les propriétés mécaniques de la surface imagée. Ainsi, un décalage sera induit dans le signal de phase correspondant à la différence entre la fréquence initiale et la fréquence modifiée. En plus de l'image topographique, une image de phase qui sera représentative des propriétés du matériau en surface de l'échantillon peut ainsi être produite. Elle ne peut toutefois être utilisée pour quantifier ces propriétés et est donc utilisée à titre qualitatif (Bowen et Hilal, 2009).

Dans le cadre de ce projet, des échantillons [CS/CHI]₃, [CS/COL]₂-CS, [CS/COL]₃ sont fabriqués et maintenus en milieu humide (dans du PBS 1X) jusqu'à la prise de mesure qui est aussi effectuée en milieu humide. Plusieurs zones de 25 X 25µm des échantillons sont survolées afin de vérifier l'uniformité du revêtement. Ensuite, des zones de 5 X 5µm représentatives sont imagées et la rugosité, mesurée. Un échantillon de verre aminé a aussi été imagé en guise de contrôle. Pour des raisons de coûts, cette expérience n'a été répétée qu'une seule fois.

3.4.2 Caractérisation des performances du LbL

La caractérisation des performances sert principalement à déterminer si les films LbL produits peuvent avoir un effet sur la survie des VSMC. L'objectif des revêtements conçus dans le cadre de ce projet étant de stimuler l'activité des VSMC, l'effet du bFGF en solution sur ces cellules a été vérifié. De plus, la quantité de facteurs de croissance libérée et l'effet du film sur l'adhésion et la croissance des VSMC ont été caractérisés, respectivement par test ÉLISA et culture cellulaire sur les surfaces.

3.4.2.1 Culture cellulaire

Des essais de culture cellulaire ont été menés *in vitro* sur des cellules A7R5, une lignée de cellules musculaires lisses (VSMC) provenant de l'aorte de rat (A7r5 from rat (*Rattus norvegicus*) aorta, ATCC, Manassas, USA). Des tests d'adhésion, croissance et survie cellulaire en milieu sans sérum ont été effectués. Pour ce faire, des VSMC (< de 15 passages) sont tout d'abordensemencées dans une flasque avec du milieu complet (milieu (DMEM/F12 (DMEM/Ham's F-12 50/50 Mix (1X), Wisent bioproducts, Saint-Bruno, Canada) contenant 10% FBS (Fetal bovine serum, Invitrogen, Burlington, Canada)). Elles sont ensuite placées à 37°C et 5% de CO₂ et le milieu est remplacé tous les 2 à 3 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence. Les cellules sont ensuite incubées en présence de trypsine (Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, Invitrogen, Burlington, Canada) afin de les détacher de la flasque de culture. Elles sont comptées à l'aide d'un hématimètre puis une solution de milieu contenant la concentration de cellules voulue est fabriquée et disposée dans les puits de culture. Après 4 heures, la solution de cellules est retirée et les puits sont rincés avec du PBS afin de ne conserver que les cellules qui ont bien adhéré. Du milieu est ensuite ajouté à chacun des puits et il sera remplacé tous les 2 à 3 jours pour toute la durée de l'expérience.

Au terme de chacune des expériences de culture, l'activité métabolique des cellules vivantes est évaluée à l'aide d'une technique de coloration, l'alar blue (Resazurin Cell Viability Assay Kit, Burlington, Canada). Le principe de cette coloration repose sur l'ingrédient actif

de l'alarmar blue qui est la résazurine. Cette substance bleue est non-fluorescente, non toxique et la membrane cellulaire y est perméable. Lorsque la résazurine est métabolisée, elle est réduite en résorufine, un composé rouge et fluorescent. Ainsi, les mesures de fluorescence de l'alarmar blue sont directement proportionnelles à l'activité métabolique des cellules (O'Brien et al., 2000).

Les cellules à la surface des revêtements sont ensuite colorées à l'aide de cristal violet (crystal violet, Fisher scientifique, Fair Lawn, États-Unis) et observées au microscope afin de confirmer les résultats de l'alarmar blue.

Effet du bFGF en solution sur la survie cellulaire

En premier lieu, afin de vérifier l'effet du bFGF sur les VSMC et déterminer la quantité optimale de bFGF que devrait contenir les films LBL pour avoir un effet sur leur survie, des tests de survie cellulaire en présence de différentes concentrations connues de ce facteur de croissance ont été effectués.

Pour ce faire, les VSMC sont incubées avec des solutions contenant 0, 10, 20, 30 et 60ng/ml de bFGF pendant 1, 3 et 5 jours. Dans des plaques 96 puits, les VSMC sontensemencées à raison de 20 000 cellules par puits. Les cellules sont incubées 24h en milieu complet (37°C, 5% CO₂). La plaque 1 jour est dosée par alamar blue et sert de référence pour déterminer la proportion de cellules qui survivra à l'incubation dans des conditions sans sérum (DMEM F12 media, Life technologies inc., Burlington, Canada). Le milieu des plaques 3 et 5 jours est changé par du milieu sans sérum contenant les différentes concentrations de facteur de croissance et est remplacé tous les 2 ou 3 jours. Les plaques sont dosées à l'alarmar blue et colorées au cristal violet après 3 et 5 jours respectivement. L'expérience est répétée 4 fois dans ces conditions.

Adhésion et croissance cellulaire

L'adhésion et la croissance des VSMC ont été étudiées sur les films à base de chitosane/CS et de collagène/CS, plus spécifiquement les surfaces [CS/CHI]₃, [CS/CHI]₂-CS, [CS/COL]₃, [CS/COL]₂-CS et de verre aminé (contrôle). L'objectif consistait à évaluer l'effet de la composition des couches, et plus particulièrement de la dernière couche sur l'adhésion et la croissance cellulaire.

Pour ce faire, les films LbL sont produits tel que spécifié plus tôt. Ensuite, sous la hotte biologique, les surfaces testées sont disposées dans des plaques 24 puits. Les surfaces sont désinfectées à l'aide d'un bain de 5 minutes dans 500µl d'une solution d'éthanol 70% suivi de trois rinçages à l'eau stérile. Les surfaces sont laissées sécher pendant une nuit avant d'être ensemencées avec 20 000 VSMC dans une solution de milieu sans sérum et 1% d'antibiotique (Penicillin-Streptomycin, Invitrogen, Burlington, Canada). Des expériences préliminaires ont permis de constater qu'une adhésion en milieu sans sérum permet de mieux voir les différences d'adhésion entre les surfaces qu'une adhésion en milieu complet. Après avoir laissé adhérer les cellules pendant 4 heures à 37°C et 5% de CO₂, le milieu sans sérum est retiré. Les cellules sont rincées au PBS et 500µl de milieu complet contenant 1% de pénicilline/streptavidine sont ajoutés dans chaque puits. Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. Un dosage alamar blue et une coloration au cristal violet sont effectués après 1, 4 et 7 jours d'incubation. L'expérience est répétée 4 fois dans ces conditions.

3.4.2.2 ELISA

L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique qui permet la détection de petites quantités d'antigènes tels que des protéines, des hormones, des peptides, etc. Ce type de test repose sur un principe de base de l'immunologie selon lequel un anticorps se lie de manière spécifique à un antigène. Ainsi, en utilisant un anticorps marqué, il sera possible de quantifier précisément une faible quantité d'antigène dans un échantillon sous forme de solution. Il existe plusieurs type d'ELISA tel que l'ELISA indirect, l'ELISA sandwich ou l'ELISA compétitif. Dans le cas de ce projet, l'ELISA sandwich a été utilisé.

Les étapes principales de l'ELISA sandwich sont illustrées à la Figure 3.11. Une plaque 96 puits traitée pour devenir *high binding* est incubée avec une solution d'anticorps afin de les immobiliser sur la plaque. Les puits sont ensuite incubés avec une solution qui aura pour rôle de bloquer les groupements de la plaque qui ne seraient pas occupés par l'anticorps afin d'éviter l'adsorption non-spécifique de l'antigène. Une incubation est effectuée avec la solution contenant l'antigène (dans le cas présent, le bFGF) suivie d'une seconde incubation avec un anticorps marqué à l'aide de biotine. L'anticorps est ensuite exposé à un conjugué d'une protéine, l'avidine, qui a une forte affinité pour la biotine et d'une enzyme, *horseradish peroxidase* (HRP). Finalement, une dernière incubation est effectuée à l'aide d'un substrat enzymatique qui sera oxydé par le HRP ce qui provoquera un changement de couleur quantifiable par spectrophotométrie. Ainsi, à l'aide de gammes étalons avec des concentrations connues de bFGF, il est possible de calculer précisément la quantité de bFGF libéré par les films LbL.

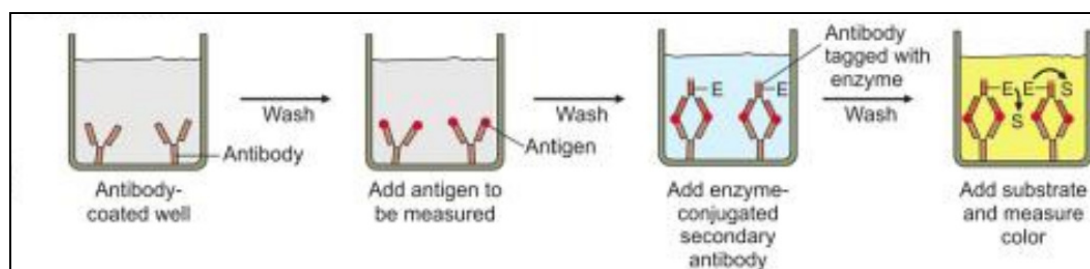


Figure 3.11 Schématisation du principe des étapes d'un ELISA sandwich
Tiré de (Kumar, 2012) p.161

Dans le cadre de ce projet, des tests ELISA sont effectués avec les kits *Human FGF-basic Mini ELISA Development* (Peprotech, Rocky Hill, États-Unis) sur deux types de films: $[CS/CHI]_3-[CS/bFGF]_2-[CS/COL]_3$ et $[CS/CHI]_3-[CS/bFGF]_2$. Le but de cette expérience est tout d'abord de quantifier le bFGF relâché par les films afin de déterminer si la quantité est optimale pour que le film puisse avoir un effet thérapeutique sur les VSMCs. Deuxièmement, la cinétique de libération des films est étudiée et comparée afin de confirmer que les couches $[CS/COL]_3$ permettent de ralentir la diffusion du facteur de croissance conformément aux hypothèses émises.

Pour ce faire, deux échantillons de chaque type ($[\text{CS/CHI}]_3$ - $[\text{CS/bFGF}]_2$ - $[\text{CS/COL}]_3$ et $[\text{CS/CHI}]_3$ - $[\text{CS/bFGF}]_2$) sont produits en plus d'échantillons $[\text{CS/CHI}]_3$ et $[\text{CS/COL}]_3$ qui serviront de contrôle afin de s'assurer qu'ils n'affectent pas les prises de mesure. Les échantillons sont placés dans une plaque 24 puits avec 500 μl d'une solution 1% BSA m/v et 0,1% v/v fungizone (amphotericin B, Gibco, Burlington, Canada). Le relargage est effectué à 37°C et après 3h, 5h, 24h, 72h et 120h, cette solution est remplacée. La solution prélevée est congelée jusqu'à la prise de mesure. Le liquide de relargage des échantillons contrôle ne sera prélevé qu'après 120 heures. Les mesures ELISA sont ensuite effectuées. Pour ce faire, la gamme étalon est effectuée avec des concentrations entre 0 et 4ng/ml de bFGF et est répétée trois fois de même que chacune des mesures effectuées à partir des liquides de relargage pour chaque spécimen.

3.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel *statgraphics* (statgraphic centurion, statpoint technologies, inc, Warrenton, États-Unis). Comme les tests conduits dans le cadre de ce projet contiennent un petit nombre d'échantillons pour des questions de coût et de temps, l'analyse des résultats est réalisée tout d'abord à l'aide d'une analyse descriptive des données obtenue grâce à des boîtes à moustaches. Les points extrêmes sont identifiés et éliminés au besoin.

Ensuite, comme il est difficile d'affirmer que les données respectent une certaine distribution (une distribution normale par exemple) pour un petit nombre d'échantillons, des tests statistiques non-paramétriques sont menés. Dans le cas des essais effectués ici, une analyse à plus de deux groupes est nécessaire. Un test Kruskal-Wallis (KW) est donc utilisé avec un seuil significatif de 0,05. Lorsque le résultat du test est significatif, des encoches sur les médianes des boîtes à moustache sont effectuées, tel que proposé par *statgraphics*, afin de déterminer entre quel(s) groupe(s) il est possible d'observer une différence significative. Tel que présenté en exemple sur la Figure 3.12, les encoches tracées représentent l'intervalle de confiance associé aux médianes. Si les encoches de deux groupes d'échantillons ne se

chevauchent pas, il est alors possible d'affirmer qu'il y a une différence significative entre les médianes. Dans l'exemple présenté ici (Figure 3.12), la médiane du groupe 1 est significativement différente de celles des groupes 2 et 3 tandis que les médianes des groupes 2 et 3 ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre.

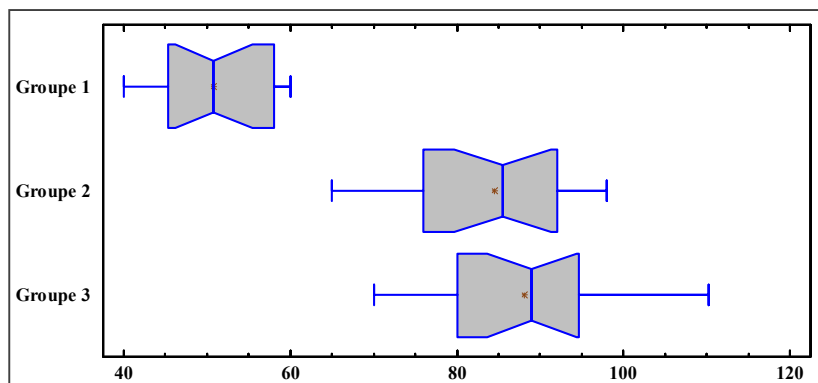


Figure 3.12 Exemple de boîtes à moustaches avec encoches sur la médiane

Ensuite, comme les tests non-paramétriques ont tendance à avoir une puissance de test plus faible pour de petits échantillons, des tests paramétriques sont aussi effectués bien que la normalité des distributions ne peut être affirmée de manière certaine. Les conclusions sont comparées avec celles des tests non-paramétriques afin de voir si elles abondent dans le même sens. Pour ce faire, des tests ANOVA sont utilisés. Lorsque le résultat est significatif, afin de déterminer quelle(s) moyenne(s) sont significativement différentes les unes des autres, des tests d'étendue multiple sont effectués à partir de la méthode LSD (*least significant difference*) de Fisher.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET ANALYSE

4.1 Objectif A : Capacité à construire un film LbL à l'aide de substances d'intérêt

Le sous-objectif A consistait à démontrer la capacité de produire un revêtement LbL à l'aide de substances d'intérêt pour l'amélioration de la guérison des vaisseaux sanguins, tel que présenté dans la section revue de littérature. Plus précisément, les substances ciblées sont le collagène de type I (COL), le sulfate de chondroïtine (CS), un facteur de croissance (le bFGF) ainsi que le chitosane (CHI). Les films développés pour répondre à cet objectif sont [CS/CHI], [CS/COL] ainsi que [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL]. Chacun de ces films ont été caractérisés par QCM-D, angle de contact, AFM et ellipsométrie.

4.1.1 Caractérisation du film [CS/CHI]

La caractérisation QCM-D du film [CS/CHI] s'est effectuée en construisant le revêtement directement sur les capteurs, soit sur un substrat d'or. Trois expériences ont été effectuées chacune comprenant la fabrication de 4 échantillons. La Figure 4.1 présente une évolution type de la fréquence et de la dissipation obtenues pour la formation de ce type de film LbL.

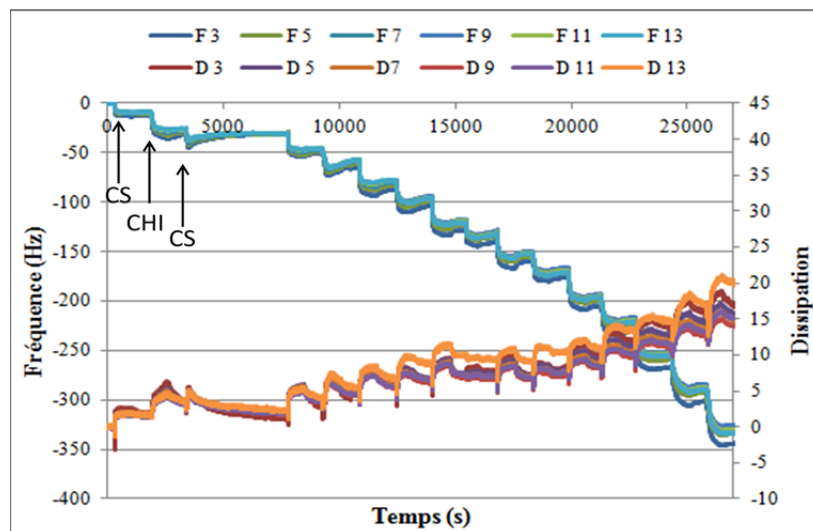


Figure 4.1 Résultats types de fréquence et de dissipation type pour un film LbL [CS/CHI] sur un substrat d'or

On observe au fil des dépôts de polyélectrolytes, une diminution graduelle de la fréquence de même qu'une augmentation de la dissipation, ce qui indique une addition de masse au fil de la formation des couches (Figure 4.1). Ainsi, le reversement de charge après chaque dépôt s'effectue de manière adéquate ce qui permet l'adsorption de plusieurs couches LbL sur le substrat. La forme en escalier des courbes présentées ici est d'ailleurs typique des films LbL (Croll et al., 2006; Notley, Eriksson et Wagberg, 2005; Tan et al., 2013). Il est possible de constater la stabilité des courbes de fréquence après chaque dépôt de polyélectrolytes ce qui montre que le temps de déposition choisi, soit 20 minutes, permet d'atteindre un équilibre où le processus de déposition du LbL est autorégulé. Ainsi, un temps de déposition plus élevé que 20 minutes ne permettrait probablement pas une adsorption d'une plus grande quantité de polyélectrolytes dans les conditions testées. En effet, tel que mentionné dans la section revue de littérature, les interactions de répulsion entre les espèces de même charge limitent la croissance des couches et autorégulent le processus. De cette façon, on s'assure que les petites variations qu'il pourrait y avoir au niveau du temps de déposition n'affecteront pas la quantité de polyélectrolytes déposée puisque celle-ci est déjà maximale. Ensuite, la stabilité après chacune des étapes de rinçage indique qu'il n'y a pas de désorption des polyélectrolytes suivant chaque dépôt et les couches absorbent peu d'eau ce qui mène à la formation d'un film plutôt rigide. Les courbes de dissipation montrent d'ailleurs de faibles variations indiquant

que les molécules adsorbées sur le capteur ont une conformation plutôt compacte et confirment que peu d'eau est absorbée à l'intérieure du film au fil de sa construction. Ce comportement est d'ailleurs favorisé par le fait que les polyélectrolytes utilisés sont fortement chargés.

À partir des courbes de fréquence et de dissipation, la masse après chaque étape de rinçage a été calculée à l'aide du modèle de Voigt (Figure 4.2). Une courbe de régression a ensuite été tracée en tenant compte de tous les échantillons fabriqués. Certaines épaisseurs qui ne semblent pas concorder avec le comportement général des courbes de fréquence ont été retirées (Figure 4.2, points oranges). Les analyses de régression effectuées sur *Statgraphics* indiquent que l'un des R^2 les plus élevés, soit 85%, est associé au modèle linéaire ($p < 10^{-4}$) (voir Annexe III, Tableau - A I - 1). Il est intéressant de constater que l'épaisseur des premiers dépôts est plutôt variable tandis que l'étendue des résultats est moins élevée pour les dépôts suivants. Comme les premières couches semblent généralement plutôt minces (entre ~ 5 et 10 nm), il est possible que le substrat ne soit couvert complètement qu'après le dépôt de quelques couches. Ce phénomène expliquerait potentiellement la variabilité des résultats d'épaisseur pendant la même période.

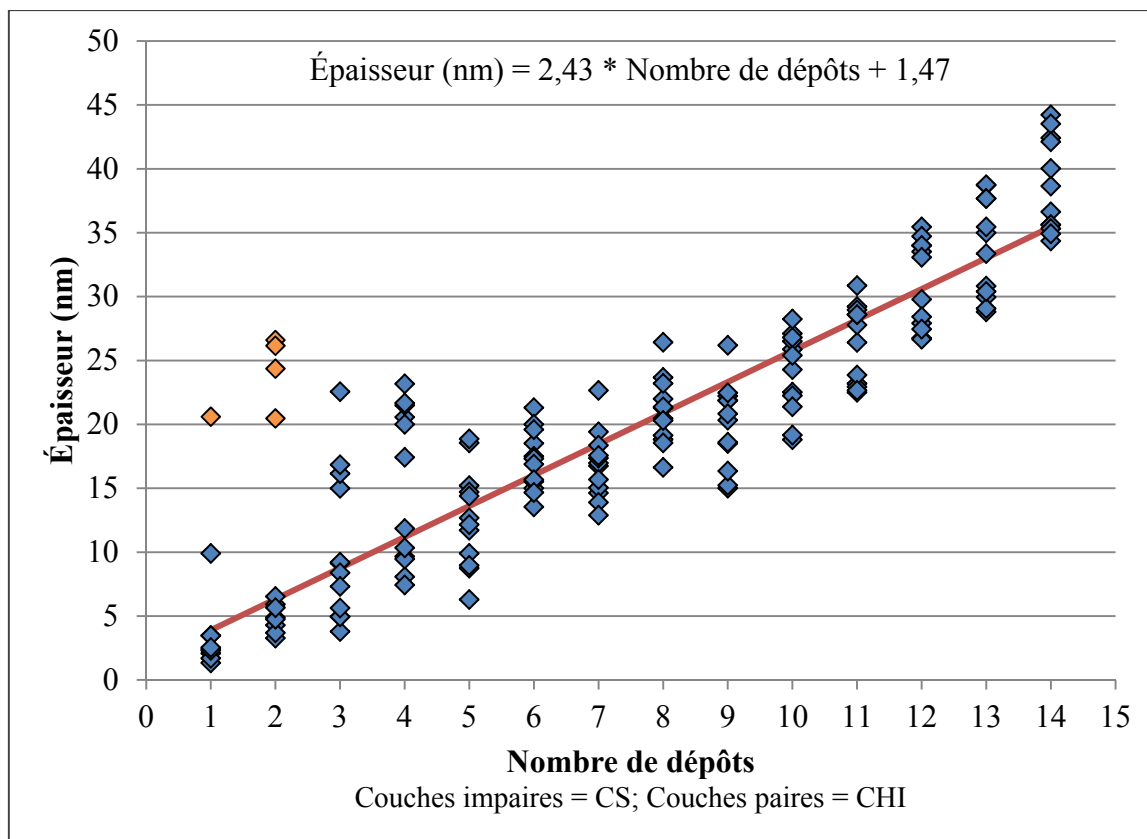


Figure 4.2 Épaisseurs calculées par le modèle de Voigt après chacune des étapes de rinçage pour la formation d'un revêtement LbL [CS/CHI] sur un substrat d'or (n=12)

Le film [CS/CHI] a ensuite été caractérisé par angle de contact en utilisant un substrat de verre aminé. Cette expérience a été menée trois fois et chacune comprenant 10 échantillons sur lesquels ont été déposés différents nombres de couches de polyelectrolytes allant de 1 à 10 couche. Trois mesures d'angle de contact ont été prises sur chacun des échantillons puis les résultats ont été moyennés (Figure 4.3).

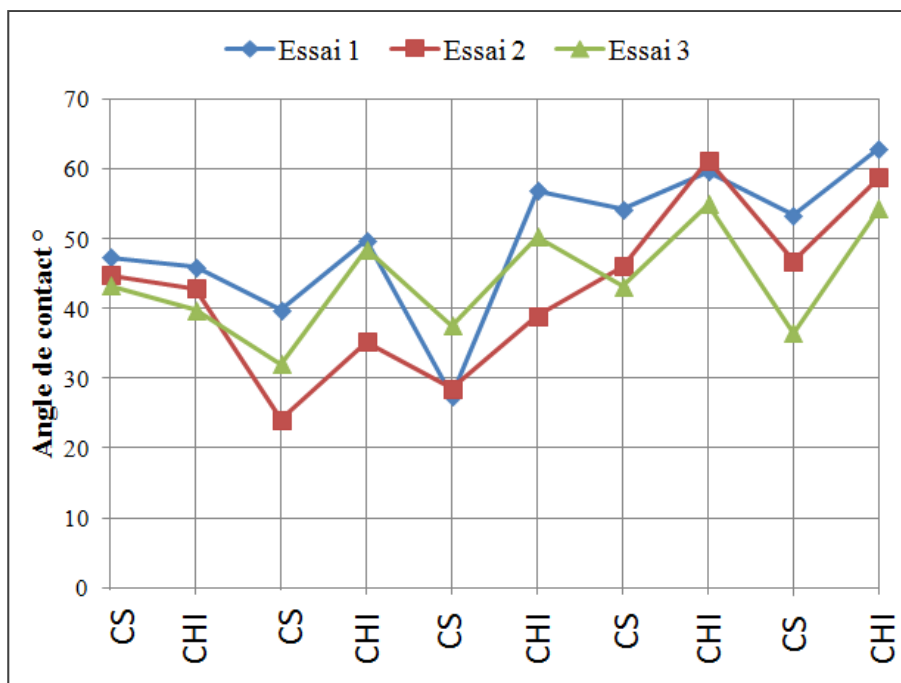


Figure 4.3 Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/CHI] sur un substrat de verre aminé ($n = 3$)

Les mesures d'angle alternent avec les dépôts de CS et de CHI et la tendance générale des courbes va vers un angle de contact de plus en plus élevé. Ces valeurs indiquent que les dépôts se terminant par une couche de CHI semblent plus hydrophobes que ceux se terminant par le CS; ce qui fait remonter les valeurs d'angle de contact après leurs dépôts. Ce comportement concorde d'ailleurs avec celui de plusieurs films LbL contenant du CHI et dont la caractérisation par angle de contact a été rapportée dans la littérature (Fu et al., 2005; Liu, He et Gao, 2005; Lundin et al., 2011). Ainsi, les résultats semblent démontrer un changement de nature du film LbL après chaque dépôt de polyélectrolyte. Le revêtement serait donc construit à la manière LbL ce qui permettrait, théoriquement, la formation d'un film avec un nombre de couches élevé. En effet, les résultats tendent à indiquer que la couche supérieure du revêtement LbL est probablement principalement composée du polyélectrolyte déposé, soit CS ou CHI, ce qui concorde avec le renversement de charge adéquat observé lors de la caractérisation par QCM-D.

Des images topographiques et des images de phase ont été obtenues par AFM sur une surface contrôlée de verre aminé (Figure 4.4 a et c) ainsi que sur un échantillon $[\text{CS}/\text{CHI}]_3$ (Figure 4.4 b et d).

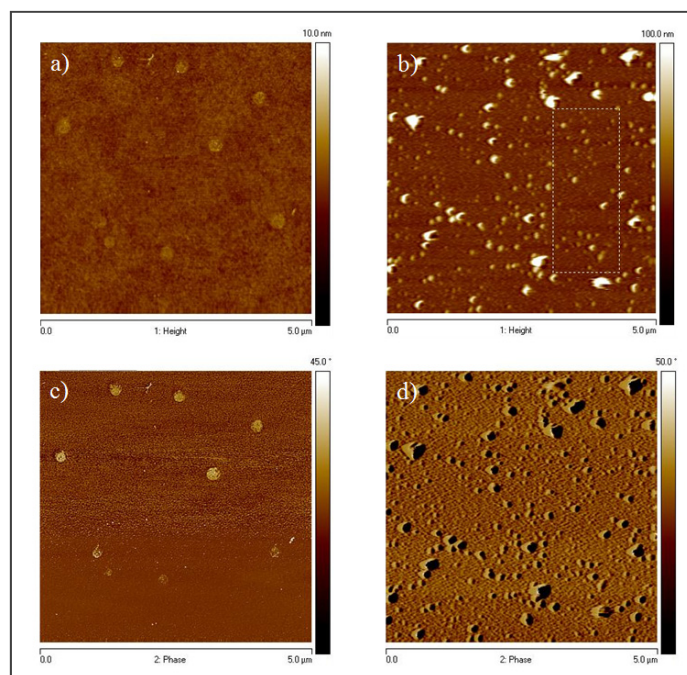


Figure 4.4 AFM : images topographiques (a,b) et images de phase (c,d) d'un substrat de verre aminé (a et c) et d'un film $[\text{CS}/\text{CHI}]_3$ sur verre aminé (b et d)

Sur les échantillons LbL, elles montrent des amoncellements de matière localisés qui créent une rugosité de surface moyenne de 9,51 nm. Toutefois, en mesurant la rugosité moyenne sur une zone représentative de la surface (zone pointillée sur la Figure 4.4), la rugosité moyenne est de 4,60 nm. L'image de phase, quant à elle, démontre que les propriétés du matériau de surface sont uniformes. Comme les zones foncées de l'image de phase sont bien définies et correspondent aux amoncellements de matière de l'image topographique, ces déphasages locaux sont attribuables à l'interférence qu'ils créent lors du passage de la sonde plutôt qu'à un changement local de propriété. De plus, il est possible de constater un changement au niveau de l'image de phase entre le verre aminé et l'échantillon LbL indiquant que le substrat est probablement entièrement recouvert par le film.

4.1.2 Caractérisation du film [CS/COL]

Le film [CS/COL] a été caractérisé tout d'abord à l'aide du QCM-D en fabriquant le revêtement directement sur les capteurs. Pour chaque expérience, quatre échantillons ont été fabriqués et l'expérience a été répétée trois fois. La Figure 4.5 présente des courbes types de fréquence et de dissipation acquise pendant la construction du film.

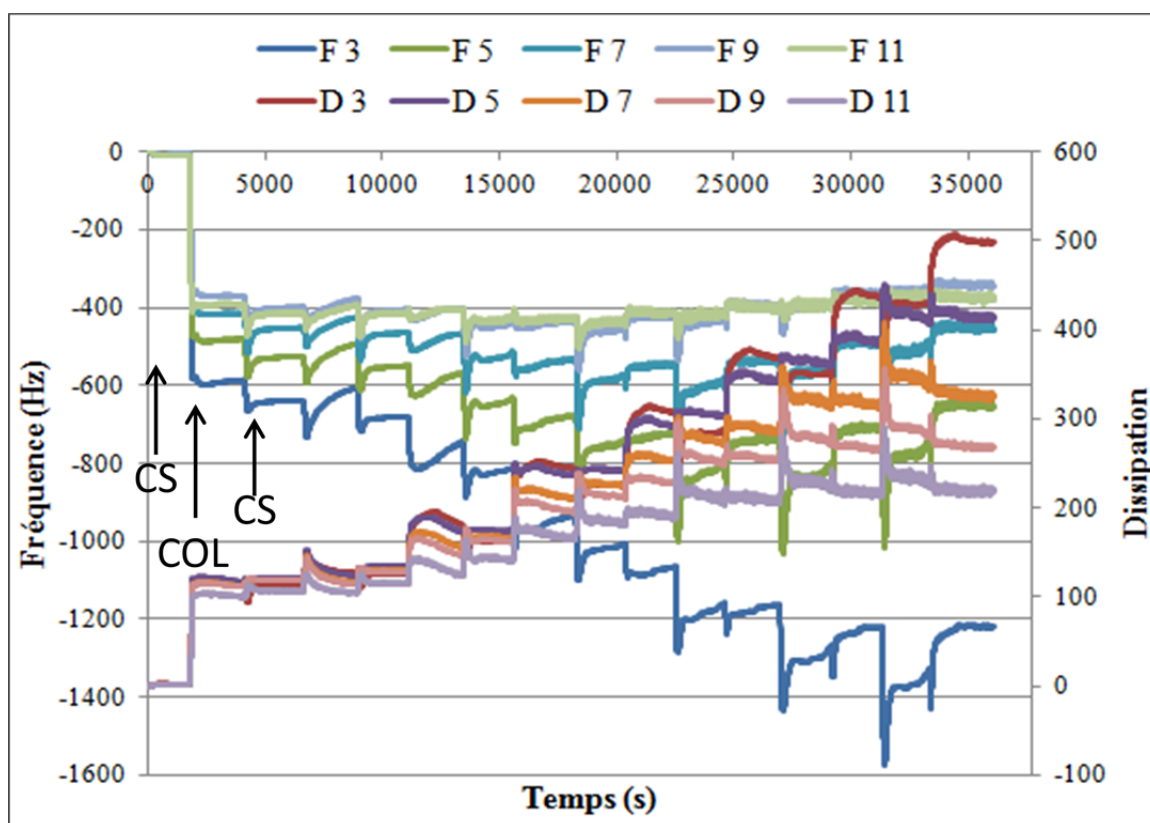


Figure 4.5 Résultat type de fréquence et de dissipation pour la formation d'un film [CS/COL] sur un substrat d'or

Il est possible d'observer une diminution de la fréquence de même qu'une augmentation de la dissipation au fil des dépôts indiquant une addition de masse après chaque dépôt de polyélectrolytes. Ainsi, le renversement de charge est adéquat et permet la fabrication d'un film LbL. Il est aussi possible d'observer que le premier dépôt de COL induit une variation de dissipation assez importante (~100) et qu'à partir de cette étape, les courbes de fréquence et de dissipation commencent à se disperser indiquant une dépendance entre ces signaux et

l'harmonique à laquelle les mesures sont prises. Ainsi, au fil des dépôts de collagène, le caractère viscoélastique du film est amplifié de plus en plus. Les molécules de collagène sont donc adsorbées dans une conformation relâchée ce qui permet la formation de couches épaisses et très hydratées. Ensuite, il est aussi possible de constater que l'adsorption de la deuxième couche de CS provoque une diminution de la dissipation alors qu'une addition de masse sur le capteur provoque typiquement une augmentation de la dissipation. Dans le cas présent, l'adsorption de la couche de CS rigidifie le film LbL ce qui induit une diminution de la dissipation tel que précédemment observé dans la littérature pour un film du même type (Mhanna, Voros et Zenobi-Wong, 2011). La conformation des molécules de CS est donc plus compacte que celle de COL et induit la formation de couches plus rigides. Ce comportement s'estompe toutefois au fil des dépôts et le caractère viscoélastique conféré au film par les couches de COL prend graduellement le dessus. Les couches de CS provoquent toutefois toujours des variations de dissipation considérablement plus faibles que celles obtenues pour le COL.

À partir des données de fréquence et de dissipation obtenues, l'épaisseur du film LbL après chaque dépôt a été calculée à l'aide du modèle de Voigt (Figure 4.6). Une courbe de régression a ensuite été tracée à l'aide des épaisseurs trouvées (courbe rouge, Figure 4.6). Comme l'épaisseur de la première couche de CS est considérablement plus faible que pour le reste du revêtement, les données de cette couche n'ont pas été prises en compte pour le calcul de la régression étant donné qu'elle n'est pas représentative du reste du film.

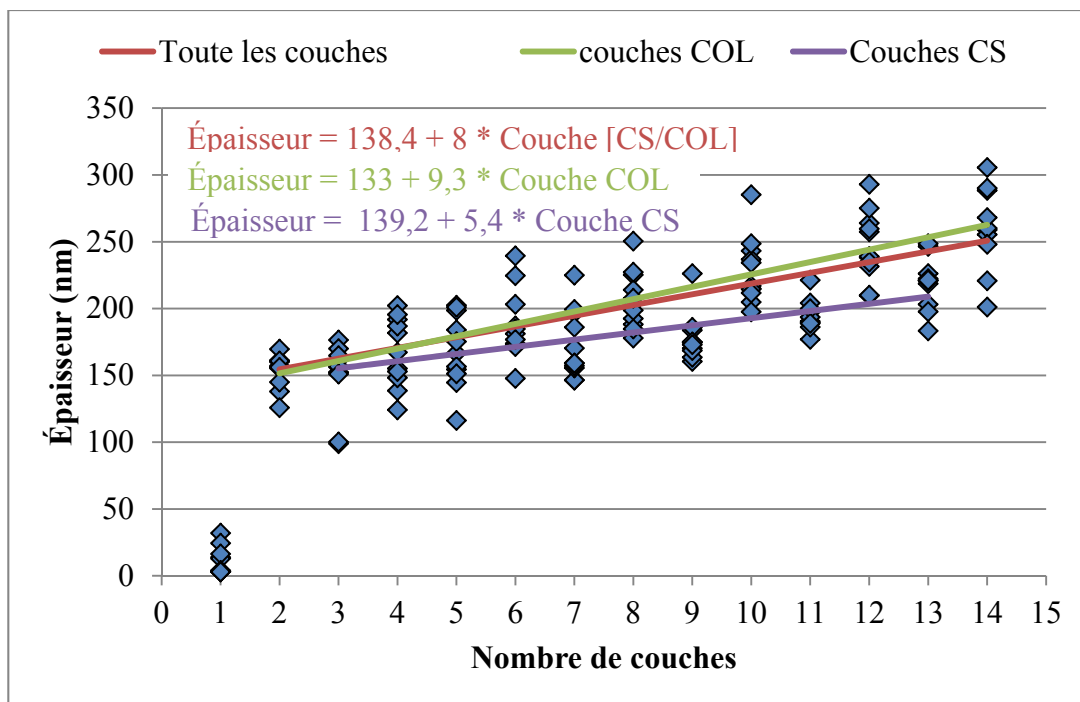


Figure 4.6 Épaisseurs calculées par le modèle de Voigt après chacune des étapes de rinçage pour la formation d'un revêtement LbL [CS/COL] sur un substrat d'or (n=12)

Les analyses de régression (voir annexe III, Tableau - A III - 1) indiquent que l'un des modèles possédant le R^2 parmi les plus élevées (55%) est le modèle linéaire ($p < 10^{-4}$). La valeur du R^2 est toutefois plutôt faible. En regardant les épaisseurs calculées pour chacune des couches, il est possible de constater que les couches de CS engendrent des épaisseurs légèrement plus faibles que le COL, ce qui concorde avec ce qui a été observé sur les courbes de fréquence et de dissipation. Comme la régression est sans doute affectée par ce comportement, une seconde régression a été tracée afin de vérifier le choix du modèle linéaire en considérant séparément les couches de COL et de CS (sur la Figure 4.6, courbes verte (COL, R^2 71%, $p < 10^{-4}$) et courbe mauve (CS, R^2 50%, $p < 10^{-4}$). Selon le modèle choisi, la croissance s'effectuerait donc à raison d'environ 5 nm par dépôt de CS et 9 nm par dépôt de COL. Pour 10 couches par exemple, l'épaisseur moyenne calculée est ~ 228 nm ce qui est dans le même ordre que ce que Zhang et al. ont trouvé pour un film LbL de COL et d'acide hyaluronique, soit 270 nm pour le même nombre de dépôts (Zhang et al., 2005).

Le film [CS/COL] a ensuite été caractérisé par ellipsométrie afin de confirmer les résultats obtenus par QCM-D. Pour ce faire, les films LbL ont été fabriqués sur des gaufres de silicium couvertes d'un revêtement L-PPE :N. Pour chaque échantillon, 3 mesures ont été effectuées et l'expérience a été répétée 3 fois. Les résultats sont présentés à la Figure 4.7. Eux aussi montrent une croissance à peu près linéaire pour les 3 essais menés. Par contre, on constate que pour 9 dépôts, l'épaisseur du film [CS/COL] est d'environ 25 nm alors que pour les résultats QCM-D, l'épaisseur calculée par le modèle de Voigt pour le même nombre de dépôts est d'environ 177 nm, ce qui est considérablement plus élevé. La principale raison de cette différence réside probablement dans le fait que les mesures d'ellipsométrie ont été effectuées sur des films secs alors que les mesures QCM-D représentent des épaisseurs hydratées étant donné qu'elles sont prises lors de la formation du film. Les résultats présentés ici sont comparables aux résultats obtenus par Lin et col. pour un film LbL combinant héparine et COL. Ils obtiennent une croissance linéaire du film et une épaisseur de ~ 35 nm pour un film à 10 dépôts, ce qui est dans le même ordre que ce qui a été trouvé ici (Lin et al., 2010).

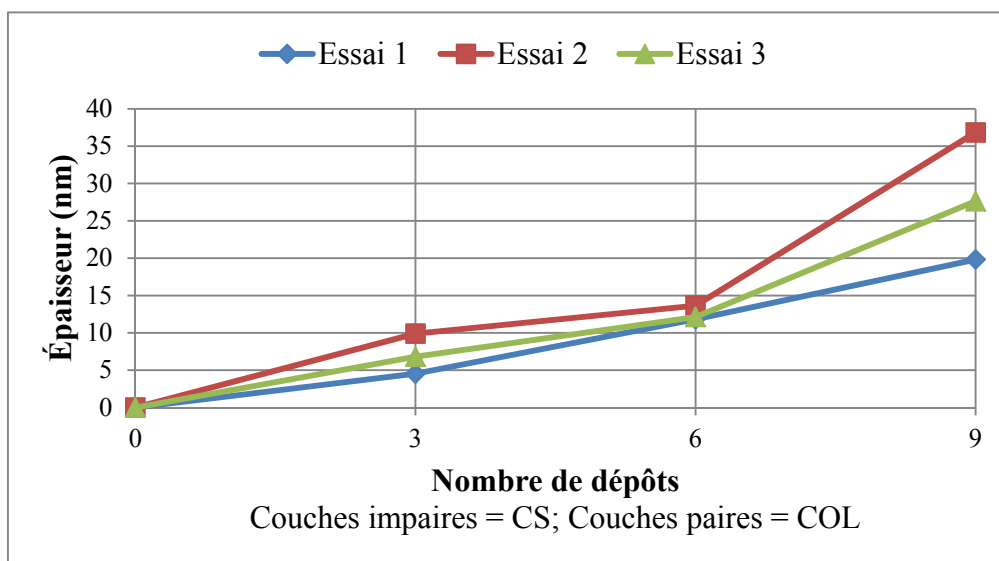


Figure 4.7 Épaisseurs issues de l'ellipsométrie pour un film [CS/COL] sur un substrat de L-PPE:N, n=3

Le film CS/COL a ensuite été caractérisé par angle de contact. Trois mesures ont été prises sur chacun des échantillons et l'expérience a été répétée 3 fois. Des courbes d'angle de contact en fonction du nombre de dépôts ont été tracées (Figure 4.8). Les résultats indiquent une claire alternance en fonction de la couche supérieure révélant un changement dans la composition du film après chaque déposition. Ce comportement suggère que les couches des films sont définies et donc qu'ils respectent la structure des films LbL. Les couches de COL génèrent des angles de contact plus élevés que les couches de CS. Ce phénomène montre que, par rapport aux couches de CS, les couches de COL ont un comportement plus hydrophobe ce qui a pour effet de faire remonter l'angle de contact après leur dépôt.

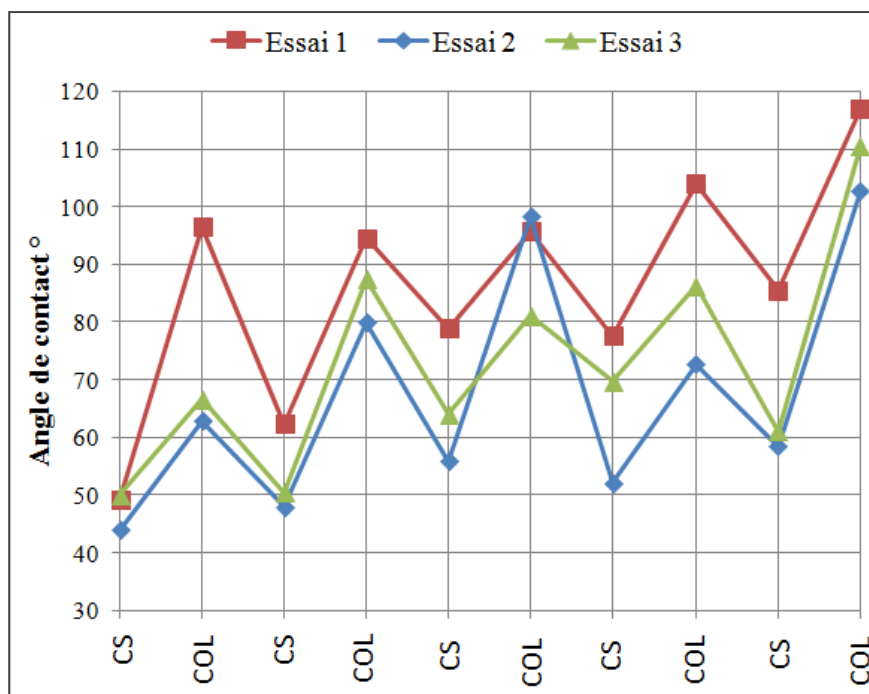


Figure 4.8 Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/COL] sur un substrat de verre aminé $n = 3$

Finalement, des échantillons $[CS/COL]_3$ et $[CS/COL]_2$ -CS ont été imagés par AFM et des images topographiques (Figure 4.9, a et b) de même que des images de phase (Figure 4.9, c et d) ont été générées. Les résultats indiquent donc un changement de rugosité entre les échantillons $[CS/COL]_2$ -CS et $[CS/COL]_3$ (9,98 nm vs 6,13 nm). Les images de phase uniformes montrent que les propriétés en surface des revêtements sont homogènes pour

chacun des échantillons et différentes en fonction de la couche supérieure. Ainsi, le changement de structure observé entre les dépôts abonde vers les conclusions des tests d'angle de contact indiquant un changement de composition après chaque déposition. Finalement, il est intéressant d'observer une structure fibreuse sur l'image de l'échantillon [CS/COL]₃ (Figure 4.9, b). Celle-ci peut être attribuable au COL étant donné qu'il consiste en une triple hélice de chaînes de polypeptides formant des fibres longues jusqu'à 300 nm et possédant un diamètre de 1,5 nm (Mhanna, Voros et Zenobi-Wong, 2011). Ce type de structure a d'ailleurs été observé plusieurs fois pour des films LbL contenant du collagène (Chaubaroux et al., 2012; Mhanna, Voros et Zenobi-Wong, 2011; Zhang et al., 2005).

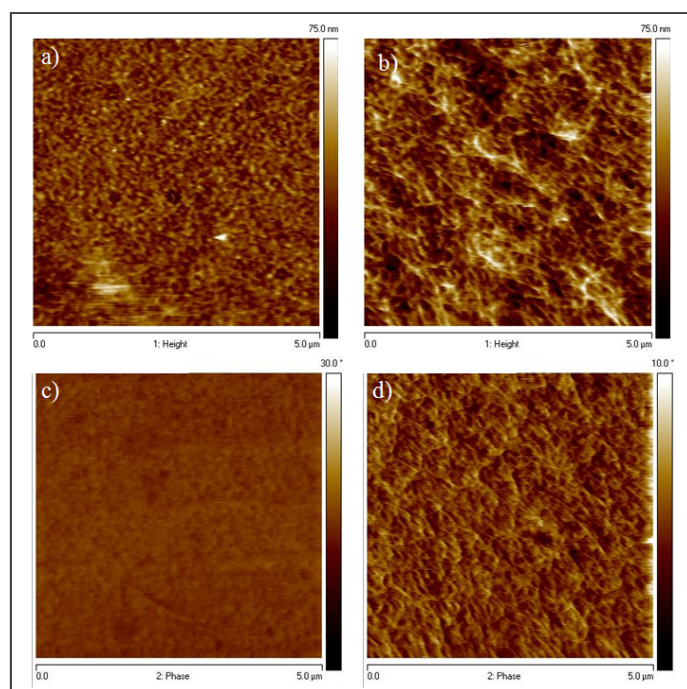


Figure 4.9 Images topographiques (a,b) et images de phase (c,d) en AFM d'un film [CS/COL]₂-CS (a et c) et d'un film [CS/COL]₃ (b et d)

4.1.3 Caractérisation du film [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL]

Mise au point des couches [CS/bFGF]

Pour mettre au point le film [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL], des essais préliminaires ont tout d'abord été menés à l'aide du QCM-D. Ceux-ci ont consisté à déposer des couches [CS/bFGF] directement sur les capteurs QCM-D et ont permis de constater que le bFGF ne permet pas un renversement de charge adéquat à l'adsorption de couches LbL subséquentes.

Pour les tests suivants, des couches de base ont été ajoutées en posant l'hypothèse qu'elles pourraient aider au renversement de charge qui ne semble pas s'effectuer lors de l'essai préliminaire. De cette façon, on s'assure que le substrat est entièrement recouvert ce qui pourrait permettre une plus grande adsorption de facteur de croissance. Les couches [CS/bFGF] ont donc été fabriquées par-dessus les couches de base [CS/CHI]₃. Une courbe type de la fabrication des couches [CS/bFGF] est présentée à la Figure 4.10. La fabrication des trois couches [CS/CHI] (non montrée sur la Figure 4.10) a généré des variations de fréquence semblables à celles de la caractérisation du même film présenté plus tôt (section 4.1.1).

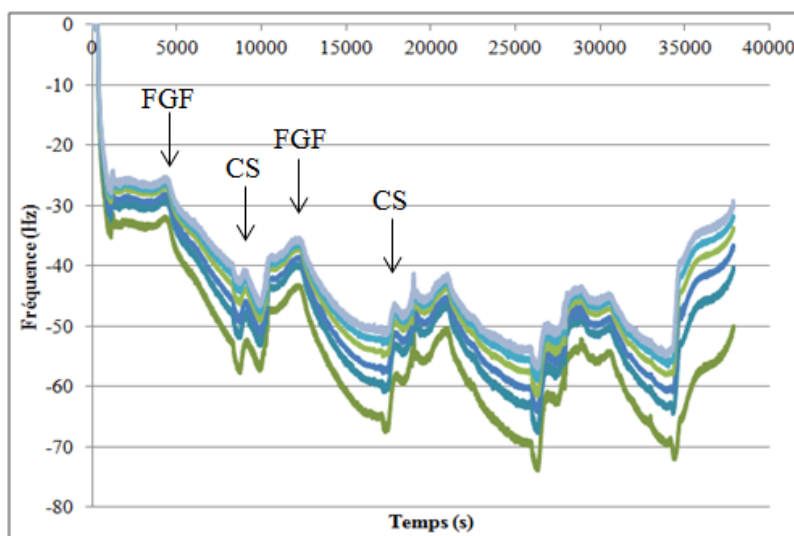


Figure 4.10 Courbe type pour la formation de couches [CS/bFGF] effectuées sur des couches de base [CS/CHI]₃ préalablement fabriquées sur les capteurs

Les résultats QCM-D de la fabrication des couches de bFGF montrent des variations de fréquence et de dissipation indiquant une adsorption de masse sur les capteurs, et ce de façon

bien plus marquée que lors des dépôts effectués sur l'or. Ces résultats confirment que l'ajout des couches de base permet l'immobilisation d'une plus grande quantité de facteurs de croissance. Les couches de CS engendrent elles aussi une diminution de la fréquence et une augmentation de la dissipation indiquant clairement une adsorption de masse après leurs dépôts et par le fait même, qu'un renversement de charge est effectué avec succès rendant possible la croissance du film LbL. Toutefois, après quatre couches de bFGF, le dépôt de CS ne semble plus induire de variation de fréquence et de dissipation par rapport au dépôt précédent. Ce phénomène pourrait s'expliquer de la façon suivante : il semble que les couches de bFGF ne possèdent pas une charge suffisamment élevée à elles seules pour un renversement de charge efficace qui permettrait l'adsorption d'une quantité de CS semblable à celle contenue dans les films [CS/CHI] par exemple. Ainsi, au fil des dépôts de bFGF, il est probable que la quantité de CS adsorbée diminue de plus en plus jusqu'après un certain nombre de couches, ici 4 couches, les interactions ne sont plus suffisantes pour induire un renversement de charge, d'où la croissance limitée des couches contenant du bFGF.

Mise au point du film complet

Finalement, le revêtement [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃ a été caractérisé par QCM-D et les épaisseurs ont été calculées à l'aide du modèle de Voigt (Figure 4.11). Les dépôts 1 à 6 consistent en la fabrication des couches de base [CS/CHI]₃, les dépôts 7 à 10 représentent la fabrication des couches [CS/bFGF]₂ et finalement, les dépôts 11 à 16 sont pour la fabrication des couches [CS/COL]₃. Il est possible d'observer une croissance du film tout au long des dépôts indiquant que peu importe le polyélectrolyte déposé, le renversement de charge s'effectue de manière adéquate.

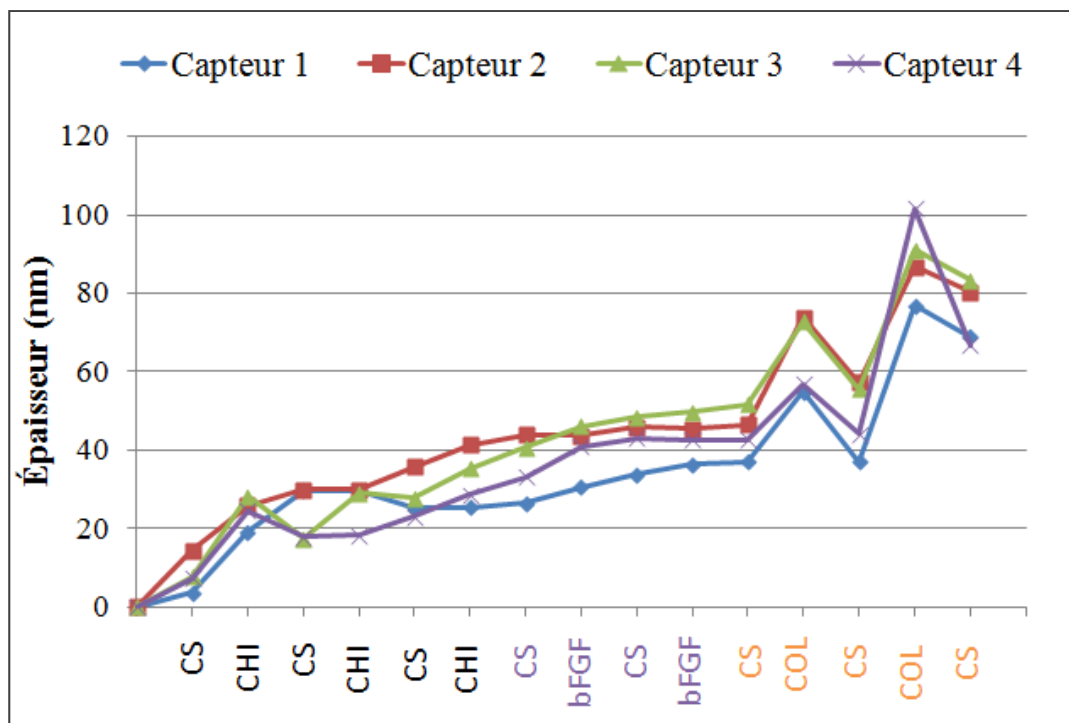


Figure 4.11 Masses calculées par le modèle de Voigt pour la fabrication d'un film $[CS/CHI]_3 - [CS/bFGF]_2 - [CS/COL]_3$

4.2 Objectif B : Capacité à produire un revêtement LbL sur un substrat de L-PPE :N

Le second objectif consistait à démontrer la capacité à produire un film LbL sur un substrat L-PPE:N pour prouver la versatilité de la technique élaborée. Le revêtement pourrait ainsi être facilement transférable sur une EC ou sur une autre variété de substrat. Pour répondre à cet objectif, un film LbL $[CS/CHI]$ a été créé sur des substrats L-PPE :N et caractérisé à l'aide du QCM-D, l'angle de contact, l'ellipsométrie ainsi que l'AFM.

Les mesures par QCM-D ont été menées en fabriquant les films sur les capteurs sur lesquels un revêtement L-PPE :N a préalablement été déposé par plasma. Pour chacune des expériences menées, un des capteurs a été soumis à un flux d'eau pendant toute la durée de l'expérience afin de s'assurer de la stabilité des substrats L-PPE :N. Des courbes de fréquence et de dissipation type sont présentées à la Figure 4.12 pour la fabrication du film $[CS/CHI]$ sur L-PPE :N. Il est possible d'observer une diminution graduelle de la fréquence

accompagnée d'une augmentation de la dissipation. Ces résultats suggèrent une addition de masse après chaque dépôt de polyélectrolytes dû au renversement de charge adéquat qui s'effectue après chacune des dépositions. La dissipation induite par la formation des couches est plutôt faible (~ 15 pour 14 dépôts) indiquant que les molécules déposées ont une conformation compacte et sont peu hydratées. Il est d'ailleurs intéressant de constater que bien que la formation du film [CS/CHI] sur L-PPE :N induise des variations de fréquences plus élevées que pour le même film sur un substrat d'or, les variations de dissipation restent du même ordre pour les deux films.

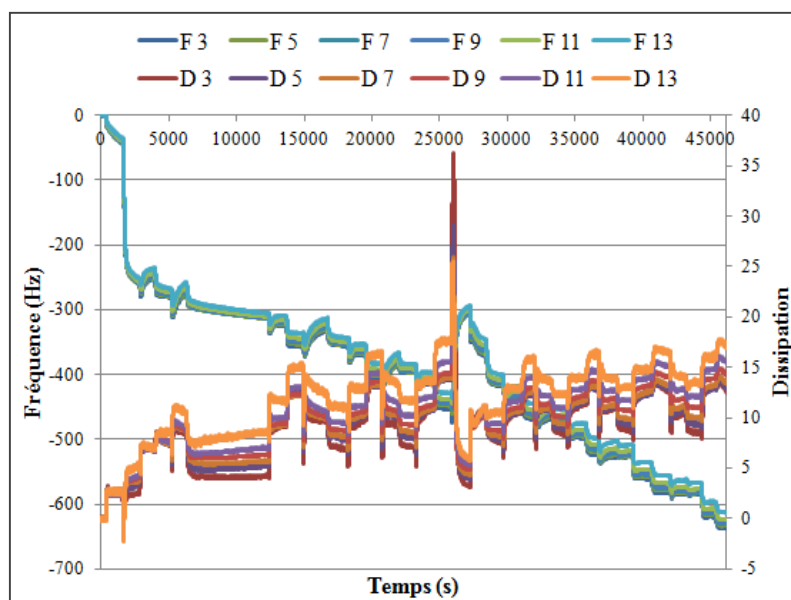


Figure 4.12 Résultat type de fréquence et de dissipation pour la formation d'un film [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N

Les épaisseurs de chacun des dépôts ainsi que du contrôle de L-PPE :N ont été calculées à l'aide du modèle de Voigt et sont présentées à la Figure 4.13. Les masses des films LbL indiquent une adsorption initiale d'une couche épaisse de CS (~ 20 nm) suivie d'une croissance régulière du film avec en moyenne ~ 4 nm pour chaque dépôt jusqu'à une épaisseur de ~ 70 nm pour 14 dépôts. Des analyses de régression indiquent que le modèle le plus représentatif du comportement des données est le modèle linéaire avec un R^2 de 63% ($p < 10^{-4}$) (Annexe III, Tableau - A III - 2). Cependant, sur la Figure 4.13 (courbe orange), on

constate que la surface contrôle de L-PPE :N subit elle aussi une augmentation graduelle de masse (~10nm après une exposition au liquide équivalent à 14 couches LbL). Ce gain pourrait s'expliquer par une lente absorption d'eau effectuée au fil du temps, même si la surface avait été auparavant immergée dans l'eau durant 15 min. pour effectuer la ligne de référence. Il est donc possible qu'une petite partie de l'épaisseur calculée sur les dépôts LbL soit attribuable à ce phénomène de gonflement du L-PPE :N.

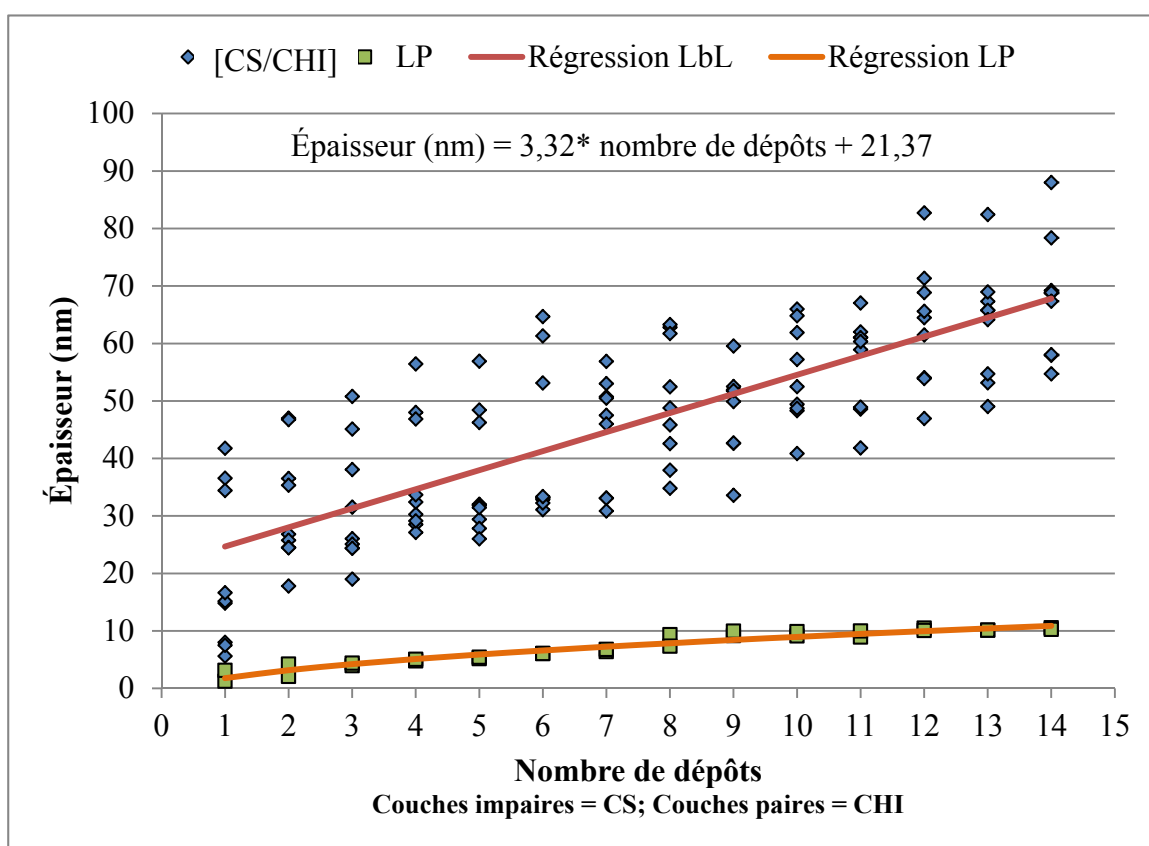


Figure 4.13 Épaisseurs moyennes calculées par le modèle de Voigt ainsi que régressions pour la fabrication de films [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE :N (n = 9 pour le film LbL et n=2 pour le contrôle L-PPE :N)

Le film a ensuite été caractérisé par ellipsométrie afin de confirmer les résultats QCM-D. L'expérience a été répétée trois fois et les films ont été fabriqués sur des gaufres de silicium revêtues de L-PPE :N. Les résultats sont présentés à la Figure 4.14. Il est possible d'observer que la croissance du film semble linéaire, ce qui concorde avec le comportement trouvé à

partir des épaisseurs calculées par le modèle de Voigt. L'épaisseur pour 9 couches est de ~50nm pour les résultats QCM-D tandis qu'elle est de ~20 nm pour les résultats d'ellipsométrie. Cette différence est probablement due au fait que, tout comme pour le film [CS/COL], les mesures d'ellipsométrie sont prises sur des échantillons secs alors que les épaisseurs calculées à partir des données QCM-D sont des épaisseurs hydratées.

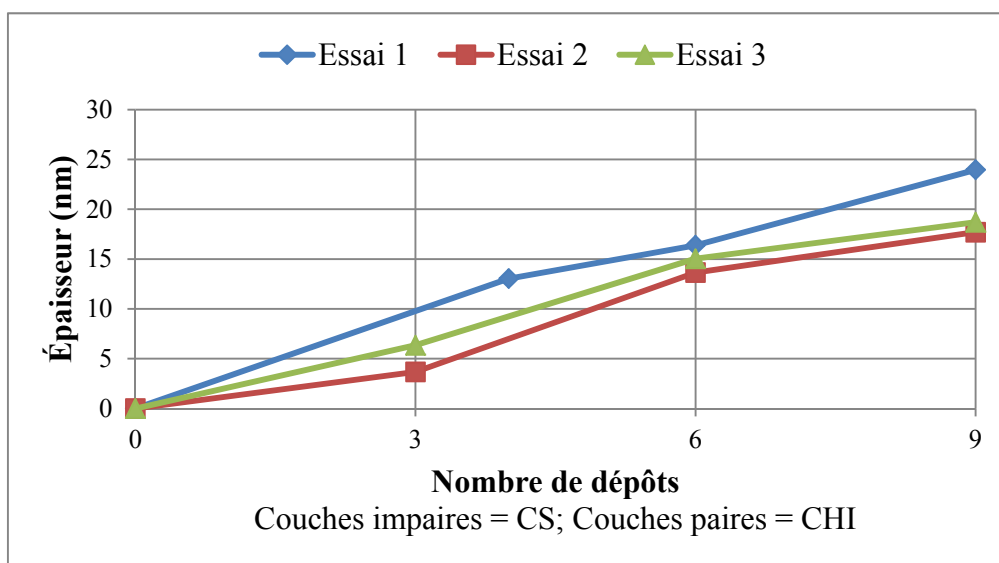


Figure 4.14 Épaisseurs déterminées par ellipsométrie pour un film [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N (n = 3)

Finalement, les films ont été caractérisés par angle de contact. Les films LbL ont été fabriqués sur des lames de verre préalablement revêtues de L-PPE :N et l'expérience a été répétée trois fois. Les résultats sont présentés à la Figure 4.15. Il est possible d'observer une alternance au niveau des angles de contact indiquant qu'il y a potentiellement un changement de nature de la couche supérieure du film Lbl après chaque dépôt. Les valeurs d'angle de contact sont plus élevées pour les couches de CHI que pour les couches de CS, ce qui indique que les couches de CHI ont tendance à être légèrement plus hydrophobes que celles de CS. Toutefois, comme pour le film [CS/CHI] sur verre aminé, les différences entre les couches sont faibles. De plus, bien que les courbes d'angle de contact aient toutes un comportement similaire, on peut observer une certaine variabilité au niveau des résultats. Ceci pourrait en

partie être attribuable au revêtement L-PPE :N qui est issu d'un procédé encore à l'étape expérimentale et dont la composition et la rugosité peut varier d'une fois à l'autre.

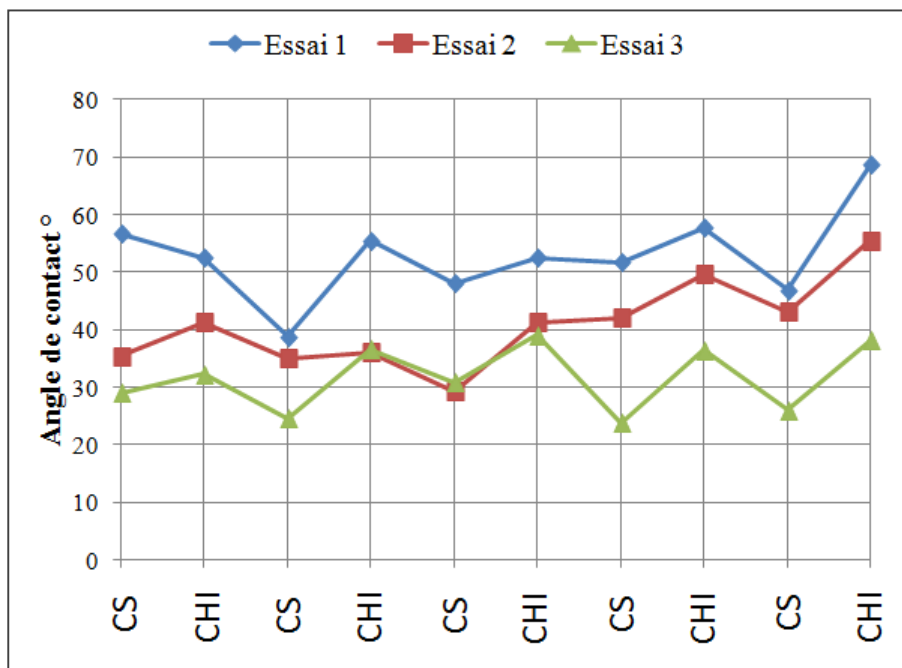


Figure 4.15 Angle de contact en fonction de la couche supérieure d'un film LbL [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE:N

4.3 Objectif C : Capacité à libérer des molécules d'intérêt

Le troisième objectif consistait à démontrer la capacité du film LbL à relarguer une quantité appréciable de molécules d'intérêt qu'il contient afin d'assurer la possibilité d'un effet thérapeutique du revêtement. Pour ce faire, deux films LbL [CS/CHI]3-[CS/bFGF]-[CS/COL] et 2 films [CS/CHI]-[CS/bFGF] ont été placés dans du PBS, sur une plaque agitatrice à 37°C pendant 5 jours afin de libérer le bFGF contenu dans les revêtements. Un ELISA a ensuite été effectué sur le liquide afin de quantifier le bFGF libéré.

Un premier test préliminaire a été effectué en utilisant une solution de bFGF 1µg/ml. Les courbes de libération obtenues (Annexe II) montrent que la quantité de bFGF libérée au bout de 5 jours varie beaucoup d'un échantillon à l'autre. De plus, la quantité maximale de bFGF

contenue dans les films LbL est de 1,8 ng (ce qui équivaut à une concentration de $\sim 3.6\text{ng/ml}$) ce qui est loin des quantités visées ($\sim 10\text{ng/ml}$), tel qu'expliqué dans la section suivante.

Un second test a été effectué en utilisant une solution de fabrication de bFGF plus concentrée ($5\mu\text{g/ml}$). Les résultats de la libération sont présentés à la Figure 4.16.

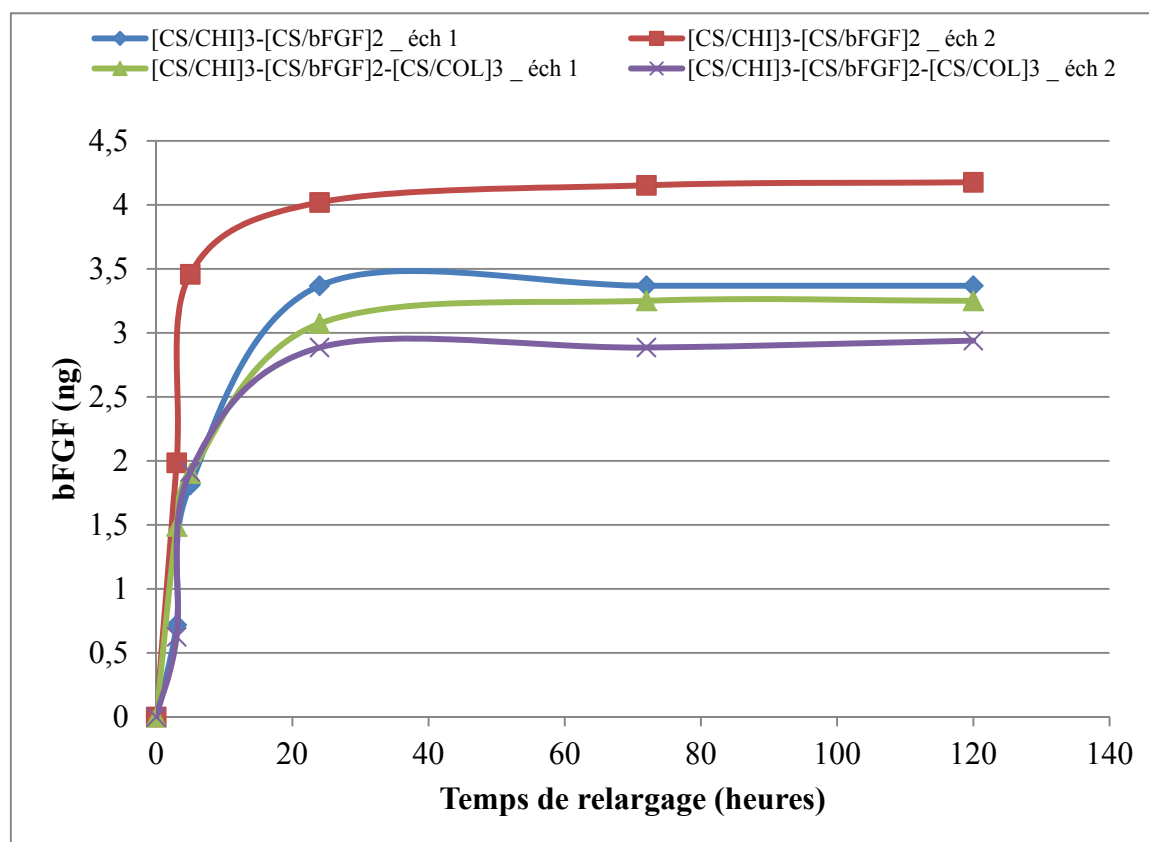


Figure 4.16 Quantité cumulative de bFGF relargué pendant 5 jours à 37°C sous agitation ($n=2$)

Les résultats montrent une libération du bFGF sur 5 jours atteignant une quantité totale entre 3,1 et 4,2 ng de facteur de croissance. L'augmentation de la concentration de la solution de fabrication a donc permis d'augmenter les quantités de bFGF libérées par rapport à ce qui a été obtenu lors du premier essai. Elles n'atteignent toutefois pas les quantités visées ($\sim 10\text{ng/ml}$) et l'efficacité est très faible si l'on compare la quantité de bFGF incubée sur chaque surface ($5\mu\text{g}$) et celle relarguée par le film ($\sim 4\text{ng}$). Il est aussi possible d'observer qu'une

grande partie du bFGF est libéré pendant les 24 premières heures, ce qui correspond probablement à une libération par diffusion (Pavlukhina et Sukhishvili, 2011). Selon les résultats présentés dans la section suivante, la libération du facteur de croissance est potentiellement trop rapide pour avoir un effet sur les VSMC. Les couches [CS/COL] ne semblent pas freiner la diffusion contrairement à l'hypothèse qui avait été posée. L'efficacité de cette partie du film pourrait sans doute être améliorée en étant réticulée tel que vu précédemment dans la littérature (Go et al., 2011). Il semble d'ailleurs que la fabrication du film [CS/COL] cause une petite perte de bFGF probablement libéré par diffusion à l'intérieur des bains de fabrication des couches CS et COL.

4.4 Objectif D : Capacité à améliorer l'adhésion, la croissance et la survie des VSMC

L'objectif D consiste à démontrer *in vitro* la capacité du film à améliorer l'adhésion, la croissance et la survie des VSMC. La concentration de bFGF requise pour obtenir un effet significatif sur nos cellules *in vitro* a été évaluée. De plus, l'effet des films LbL sur l'adhésion et la croissance de ces cellules ont été testés. Malheureusement l'étape finale prévue, qui consistait à étudier l'effet du film complet sur les cellules n'a pas pu être réalisée à cause d'une contamination des incubateurs de la salle de culture. Celle-ci a rendu erratique le comportement des cellules durant plusieurs mois.

4.4.1 Efficacité du bFGF sur les VSMC

Bien que la littérature ait montré un effet du bFGF sur les VSMC (Himmelfarb et Couper, 1997), afin de s'assurer que celui-ci a l'effet souhaité sur les VSMC de rat utilisées dans nos travaux et afin de déterminer la quantité minimale nécessaire pour induire un effet, la survie de ces cellules a été testée en présence de milieu sans sérum contenant différentes concentrations de ce facteur de croissance. Quatre concentrations de bFGF ont été testées : 10, 20, 30 et 60 ng/ml en plus de deux contrôles soit un contrôle positif, 10 ng/ml de EGF (Lequoy et al., 2014) ainsi qu'un contrôle négatif, le milieu sans sérum. L'expérience a été

répétée trois fois en utilisant quatre échantillons par condition. Des mesures d'alarmar blue et une coloration au cristal violet ont été effectuées après 3 et 5 jours de culture en présence des conditions énumérées. Les résultats d'alarmar blue ont été normalisés par rapport aux mesures effectuées sur les VSMC après 1 jour en milieu complet. Ainsi, un pourcentage de viabilité représentant la proportion de cellules ayant survécu à la culture en milieu sans sérum en présence de bFGF est obtenu (Figure 4.17).

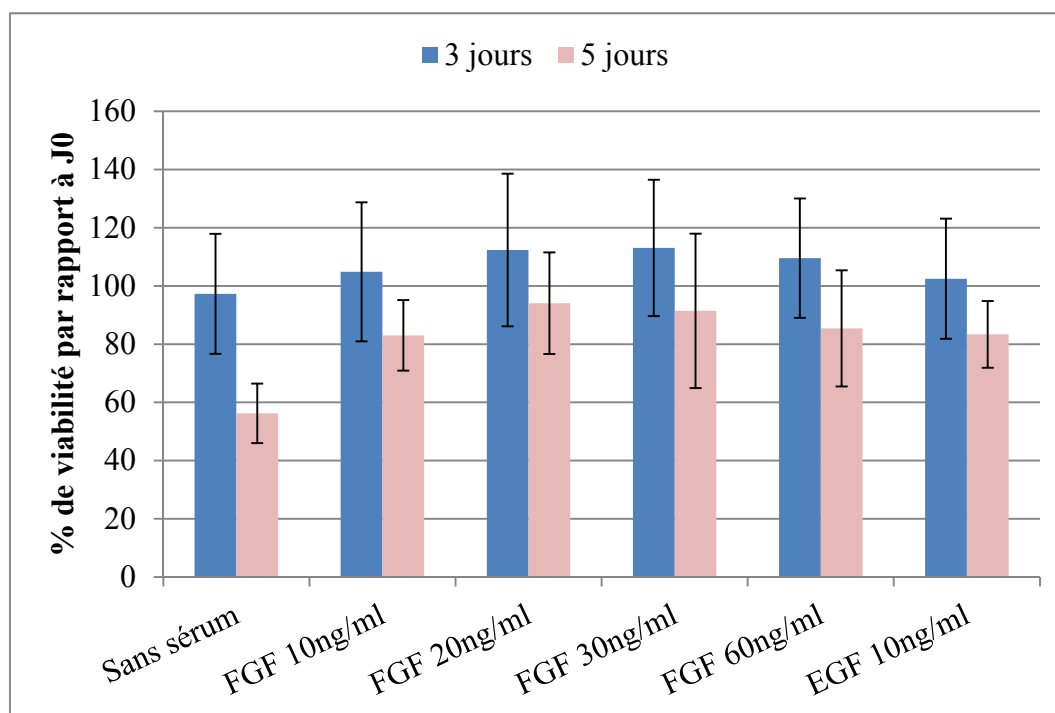


Figure 4.17 Viabilité moyenne des VSMC par rapport à J0 en milieu complet après 3 et 5 jours en milieu sans sérum et en présence de différentes concentrations bFGF en solution (n = 12)

Les résultats obtenus montrent qu'après 3 jours de culture, la viabilité des cellules tourne autour de 100% pour toutes les conditions testées et ce, même pour le contrôle négatif (sans aucun facteur de croissance). Le test statistique Kruskal-Wallis (KW) n'indique d'ailleurs pas de différence significative entre aucun des groupes pour un niveau de confiance de 95% ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} = 0,271$).

Les résultats après cinq jours de survie montrent que la viabilité des VSMC en milieu sans sérum est d'environ 55%, tandis que la survie en présence des facteurs de croissance est

supérieure à 80%. Les analyses statistiques démontrent une différence significative entre la viabilité des cellules en milieu sans sérum et toutes conditions comportant des facteurs de croissance pour un niveau de confiance de 95% ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} = 0,014$). Les statistiques descriptives sous forme de boîtes à moustaches permettent d'observer que l'encoche sur la médiane du contrôle négatif en milieu sans sérum ne chevauche aucune des encoches des conditions avec facteurs de croissance (Figure 4.18). Elles permettent donc de conclure qu'il y a des différences statistiquement significatives entre la médiane de la condition sans sérum et toutes les conditions avec du bFGF de même que le contrôle positif. Par le même raisonnement, il est aussi possible de constater que les médianes des conditions contenant des facteurs de croissance ne comportent pas de différences statistiquement significatives entre elles étant donné que leurs encoches se chevauchent.

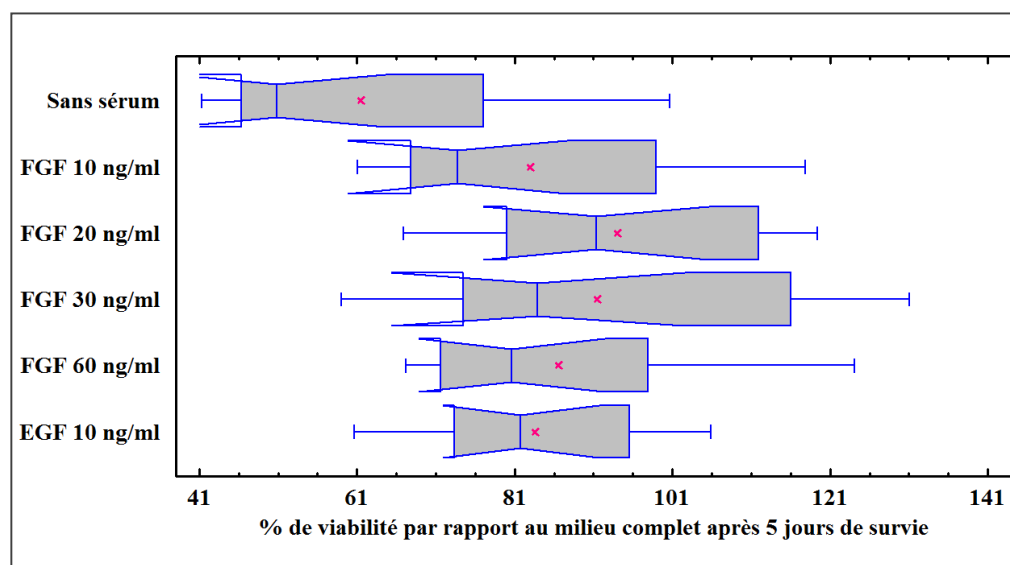


Figure 4.18 Boîtes à moustache représentant les données obtenues pour tous les échantillons de culture en milieu sans sérum après 5 jours (n=12)

Bien que le nombre d'échantillons par groupe soit limité à 12, un test ANOVA a aussi été effectué sur les résultats afin de comparer les moyennes et d'observer si les conclusions convergent avec celles des tests non-paramétriques. Les résultats indiquent une différence significative entre les moyennes ($P_{\text{ANOVA}} = 0,002$) et les tests d'étendue multiples montrent que les différences se situent entre la condition sans sérum et toutes les conditions avec des

facteurs de croissance (voir les résultats des tests d'étendue multiple en Annexe I). Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de bFGF, malgré la légère tendance observée entre 10 et 20 ng/ml, ce qui concorde avec les conclusions du test KW.

Les résultats de l'effet du bFGF sur la survie des VSMC suggèrent que le revêtement LbL fabriqué devrait être en mesure d'effectuer un relargage de bFGF sur un minimum de 5 jours tout en maintenant une concentration autour de 10 ng/ml. Comme les facteurs de croissance sont des substances coûteuses et que les résultats démontrent que cette concentration est suffisante pour obtenir un effet significatif sur la survie des VSMC, il serait potentiellement inutile de relarguer des concentrations plus élevées du moins dans le cadre des essais *in vitro*.

4.4.2 Effet des revêtements LbL sur l'adhésion et la croissance des VSMC

Les revêtements LbL sans facteurs de croissance ont été testés sur l'adhésion et la croissance des VSMC. L'effet des biomolécules choisies ainsi que l'influence de la couche supérieure des films LbL ont été évalués. Six types de surfaces ont été mises en culture, soit 4 films LbL et 2 surfaces contrôle : [CS/CHI]₃, [CS/CHI]₂-CS, [CS/COL]₃, [CS/COL]₂-CS, le verre aminé ainsi que le polystyrène (PCP). Le PCP est un contrôle positif couramment utilisé pour les expériences de culture cellulaire. Il permet de s'assurer que la croissance des cellules s'effectue normalement et, en comparant les différents essais entre eux, le contrôle PCP permet aussi de constater que les cellules se sont développées d'une manière similaire d'une expérience à l'autre.

Pour commencer, une expérience préliminaire d'adhésion en milieu complet (avec sérum) a été effectuée. Les résultats ne montrent pas de différence significative d'adhésion entre les surfaces, peu importe la densité de cellules (Figure 4.19).

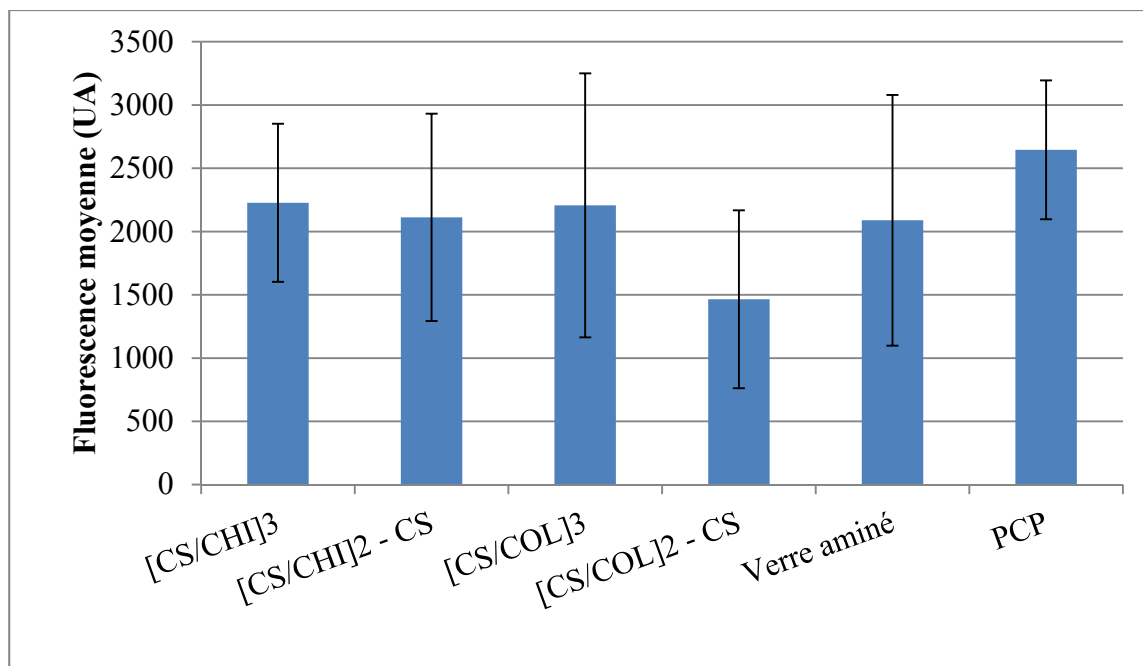


Figure 4.19 Fluorescence moyenne et écarts types pour une adhésion en milieu complet pendant 24h des VSMC sur différentes surfaces LbL (n = 4)

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que lorsque les cellules sont en présence de sérum, il y a adsorption de protéines sur les surfaces, ce qui a atténué les différences de composition. Ainsi, l'adhésion cellulaire s'effectue via ces protéines adsorbées et la nature de la surface sur laquelle elles sontensemencées n'a que peu d'influence sur leur comportement.

Suite aux résultats des tests préliminaires, les expériences de croissance suivantes ont été menées à l'aide d'une adhésion initiale de 4 heures en milieu sans sérum suivie de 20 heures en milieu complet. L'expérience a été répétée trois fois à l'aide de quatre échantillons par type de surface et les résultats de fluorescence après 1, 4 et 7 jours de croissance ont été moyennés (Figure 4.20).

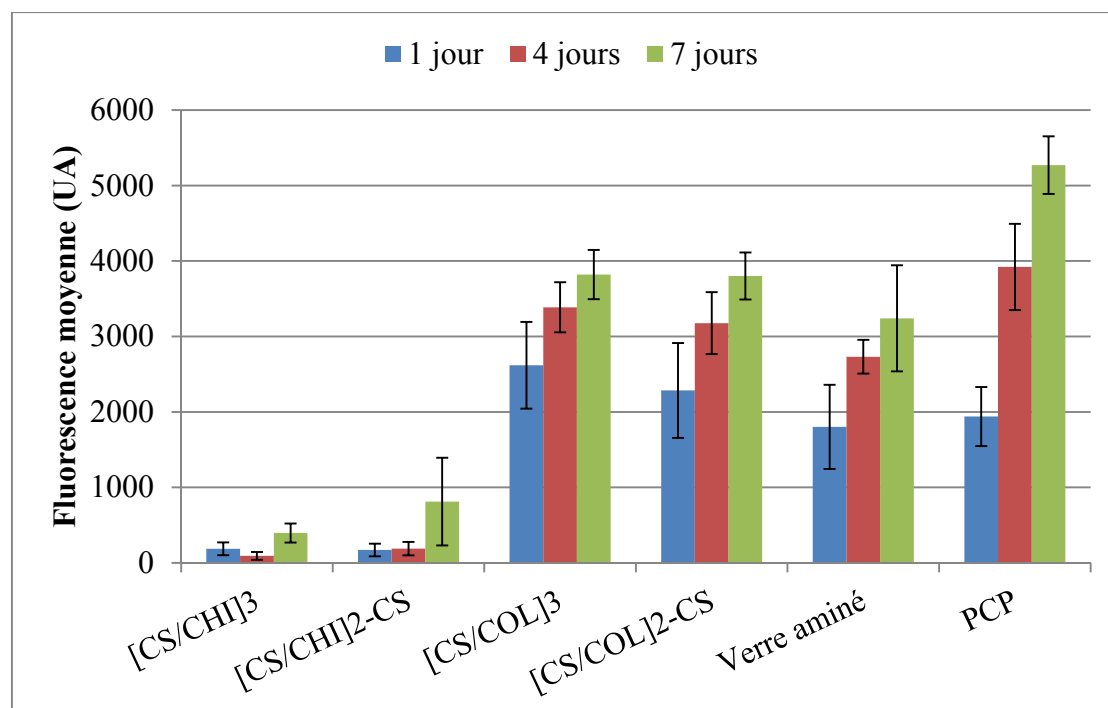


Figure 4.20 Fluorescence moyenne et écarts types pour la croissance des VSMC sur différentes surfaces LbL pendant 1, 4 et 7 jours suite à une adhésion en milieu sans sérum (n=12)

4.4.3 Adhésion

Les résultats de fluorescence obtenus après l'adhésion (Figure 4.20, 1 jour) indiquent que les surfaces LbL à base de CHI permettent l'adhésion d'une quantité de cellules considérablement moins importante que les films à base de COL ou le verre aminé.

Les tests statistiques menés montrent d'ailleurs qu'il y a une différence statistiquement significative entre les groupes ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} < 10^{-4}$ et $P_{\text{ANOVA}} < 10^{-4}$). Les boîtes à moustaches avec encoche sur la médiane montrent clairement que cette différence se situe entre les surfaces à base de CHI et celles de COL de même qu'avec le verre aminé (Figure 4.21). Il est aussi possible de constater que les médianes des revêtements à base de COL sont plus élevées que celle du verre aminé, mais comme les encoches se chevauchent, la différence ne peut être considérée comme étant statistiquement significative. Les résultats des tests d'étendue multiple pointent vers les mêmes conclusions (Annexe I).

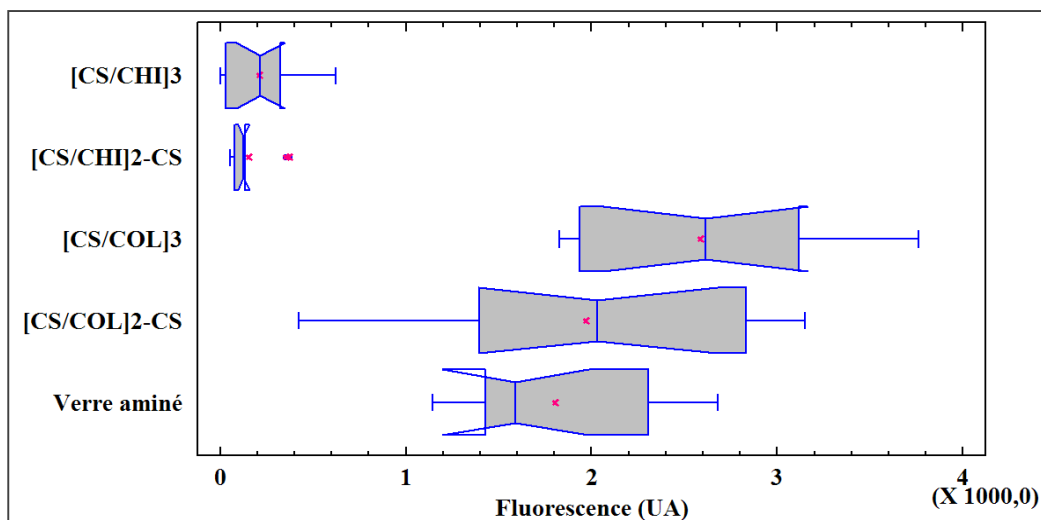


Figure 4.21 Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues pour l'adhésion des VSMC sur différents types de surface (n=12)

Une coloration au cristal violet a été effectuée après les quatre heures d'adhésion en milieu sans sérum (Figure 4.22). Il est possible d'observer une différence au niveau de la morphologie des VSMC entre les surfaces LbL à base de COL et le verre aminé. Les cellules qui adhèrent sur le verre aminé ont une forme plus ronde tandis que celles qui adhèrent sur le COL sont nettement plus étendues indiquant que l'adhésion initiale s'effectue plus rapidement et mieux sur ce type de substrat. Ces observations convergent avec les résultats des tests statistiques sur les données d'alar blue après 24 heures qui portent à croire que l'adhésion des VSMC sur les surfaces à base de COL semblent générer des données de fluorescence plus élevées que pour le verre aminé.

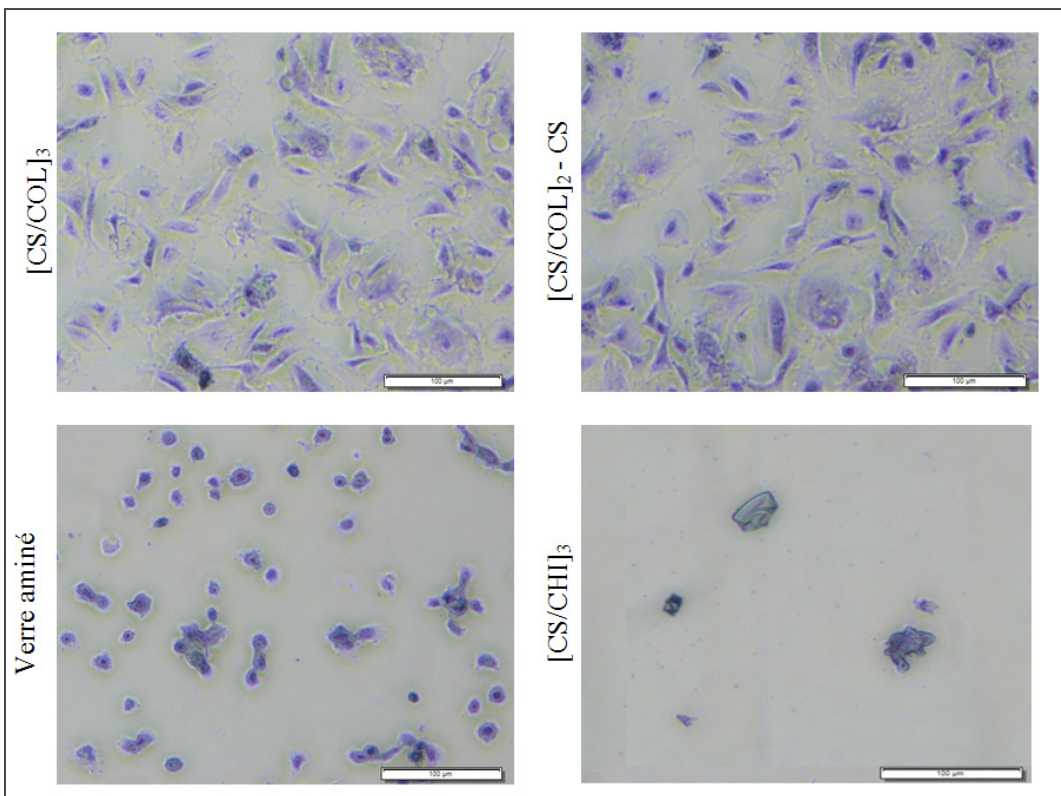


Figure 4.22 Images types suite à une coloration au cristal violet après 4 heures d'adhésion en milieu sans sérum des VSMC sur les surfaces LbL (échelle 100 μm)

Les résultats des analyses statistiques ainsi que des images de la coloration au cristal violet indiquent que les surfaces LbL [CS/CHI] ne sont pas appropriées pour l'adhésion des VSMC dans les conditions testées. Le verre aminé et les films LbL [CS/COL] permettent quant à eux une bonne adhésion des cellules. De plus, les données n'indiquent pas d'influence de la composition de la couche finale des films sur l'adhésion des VSMC.

4.4.4 Croissance

Les résultats de fluorescence après quatre et sept jours de croissance des VSMC sur les différentes surfaces LbL (Figure 4.20) montrent que les surfaces à base de chitosane ne permettent qu'une très faible croissance des VSMC par rapport aux surfaces LbL à base de collagène et le verre aminé. Les tests statistiques montrent d'ailleurs une différence

significative entre les groupes aussi bien après quatre qu'après sept jours ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} < 10^{-4}$ et $P_{\text{ANOVA}} \sim < 10^{-4}$). Les boîtes à moustaches (Figure 4.23) montrent que les surfaces à base de collagène ainsi que la surface aminée permettent une meilleure croissance des VSMC que les surfaces à base de CHI après quatre et sept jours de culture en milieu complet. Elles permettent aussi d'observer une différence significative entre les médianes des surfaces à base de collagène et la surface aminée après 4 et 7 jours de croissance. Les résultats de tests d'étendue multiple permettent d'ailleurs d'observer les mêmes différences entre les moyennes (résultats en Annexe I). De plus, il est possible de constater qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les médianes et les moyennes de fluorescence des revêtements de même nature avec une couche supérieure différente.

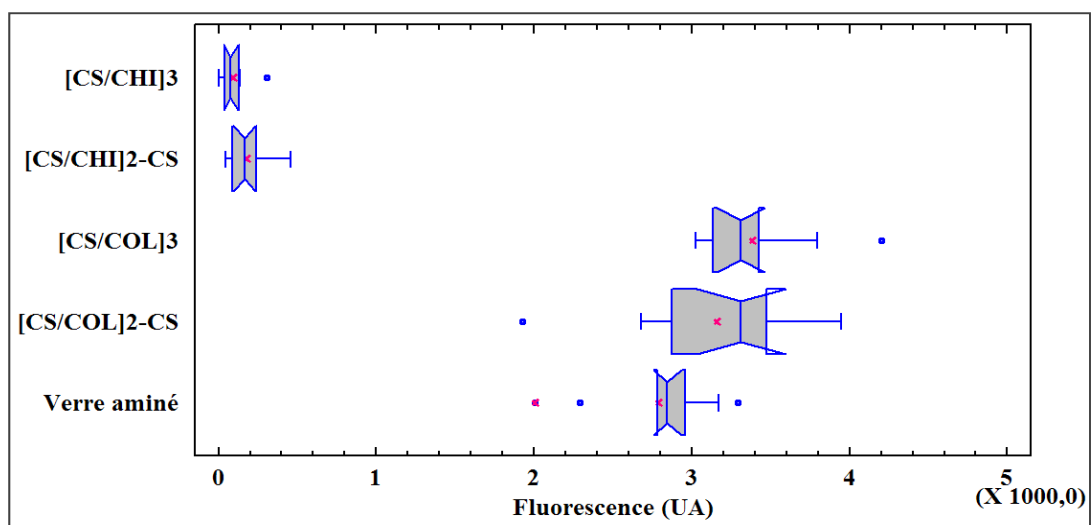


Figure 4.23 Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues après 4 jours de croissance des VSMC en milieu complet sur différents types de surface (n=12)

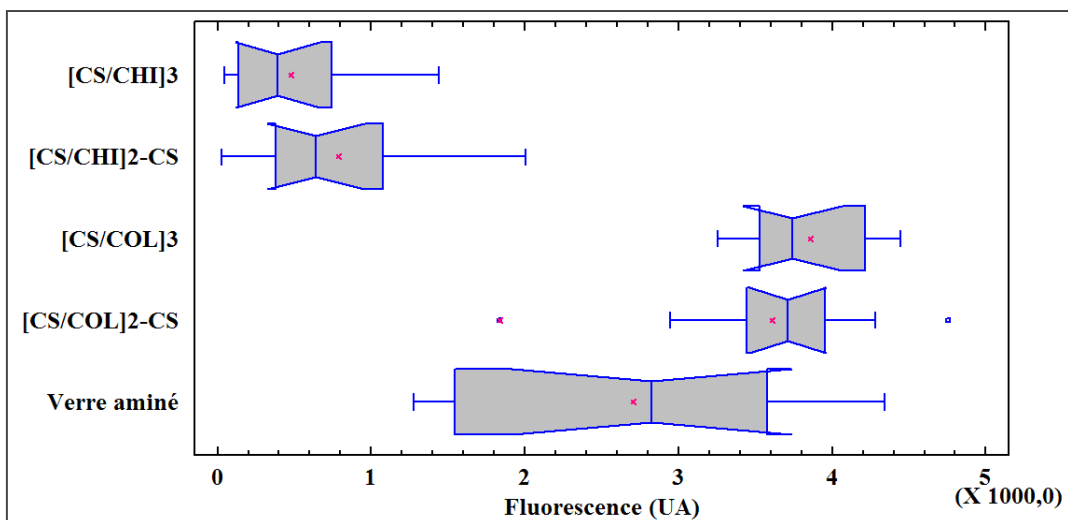


Figure 4.24 Boîtes à moustache représentant les données de fluorescence obtenues après 7 jours de croissance des VSMC en milieu complet sur différents types de surface (n=12)

En résumé, les résultats de croissance cellulaire indiquent que dans les conditions testées, les surfaces LbL à base de chitosane ne sont pas vraiment appropriées pour la croissance des VSMC. Les surfaces à base de collagène permettent l'obtention d'une fluorescence statistiquement significativement plus élevée que pour toute autre surface après 4 et 7 jours de croissance.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET LIMITES

L'objectif de ce projet consistait à concevoir un revêtement LbL afin de favoriser l'adhésion, la prolifération et la migration des VSMC pour ultimement améliorer les résultats cliniques des EC en améliorant la fixation de l'implant par la guérison du vaisseau sanguin. Pour ce faire, tel que détaillé dans la revue de littérature (section 1.4.1), des molécules d'intérêt pour la fabrication d'un tel film ont été ciblées : le CS, le CHI, le COL ainsi que le bFGF. Celles-ci ont servi au développement de plusieurs films LbL afin de répondre aux sous-objectifs fixés.

Les deux premiers sous-objectifs consistaient respectivement à 1) Démontrer la capacité de produire un revêtement de type LbL à l'aide des substances choisies et 2) Démontrer la capacité à produire un film LbL sur un substrat L-PPE:N. Pour ce faire, trois films ont été développés et caractérisés : [CS/CHI], [CS/COL] et [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL].

Les résultats des mesures QCM-D, d'ellipsométrie, d'angle de contact et d'AFM permettent de conclure positivement sur la faisabilité de créer des revêtements de type LbL de même que sur la viabilité du L-PPE :N comme substrat ainsi que de comparer les différents revêtements obtenus.

En effet, les épaisseurs moyennes hydratées des films, telles que calculées à l'aide du modèle de Voigt à partir des résultats QCM-D après chaque dépôt, montrent une croissance progressive de chacun des films au fil des couches déposées. La croissance du film [CS/CHI] sur les capteurs QCM-D de même que sur un substrat de L-PPE :N a un comportement suivant un modèle de régression linéaire. Le film [CS/COL] quant à lui, a aussi une croissance linéaire si on ne tient pas compte de la première couche de CS qui est nettement plus mince que les autres. Les résultats d'ellipsométrie confirment d'ailleurs le choix du modèle linéaire malgré un R^2 faible dans plusieurs cas. Tel qu'exposé dans la section

Surcompensation des charges de la revue de littérature (section 1.3.4.1), une croissance linéaire des films favorise une bonne compartimentation des éléments du film LbL (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012; Pavlukhina et Sukhishvili, 2011). Ce comportement est optimal dans le cas d'une superstructure où chaque partie du film a une fonction définie, surtout dans les cas où l'on souhaite relarguer des molécules comme des facteurs de croissance. Le mode de croissance linéaire est d'ailleurs typique des films LbL faits à partir de polyélectrolytes avec une densité de charge élevée comme le CHI et le CS tel qu'expliqué plus tôt (section 1.3.4.1) (Boudou et al., 2010; Detzel, Larkins et Rajagopalan, 2011).

Les épaisseurs moyennes hydratées trouvées à l'aide des résultats QCM-D pour des films à 9 dépôts sont les suivantes :

- $[\text{CS}/\text{CHI}]_4\text{-CS} \rightarrow \sim 20\text{nm}$
- $[\text{CS}/\text{CHI}]_4\text{-CS sur L-PPE :N} \rightarrow \sim 50\text{nm}$
- $[\text{CS}/\text{COL}]_4\text{-CS} \rightarrow \sim 177\text{nm}$
- $[\text{CS}/\text{CHI}]_3\text{-}[\text{CS}/\text{bFGF}]_2\text{-}[\text{CS}/\text{COL}]_3 \rightarrow \sim 80\text{nm}$

Les résultats d'ellipsométrie, obtenus à partir de films LbL sur des substrats L-PPE :N, montrent quant à eux, que pour le même nombre de dépôts, on obtient une épaisseur moyenne de $\sim 20\text{nm}$ pour le film $[\text{CS}/\text{CHI}]_4\text{-CS}$ tandis qu'une épaisseur moyenne de $\sim 25\text{nm}$ est trouvée pour le film $[\text{CS}/\text{COL}]_4\text{-CS}$. On constate que ces épaisseurs sont nettement inférieures à celles calculées à partir des résultats QCM-D. Cette différence peut probablement être en grande partie attribuable au fait que les mesures QCM-D sont effectuées alors que les films LbL possèdent une hydratation maximale, tandis que les mesures d'ellipsométrie sont effectuées à l'état sec.

Ensuite, il est possible de constater avec les épaisseurs QCM-D que la fabrication du film $[\text{CS}/\text{CHI}]$ sur un substrat de L-PPE :N permet la formation d'un film LbL environ deux fois plus épais que lorsqu'il est fabriqué directement sur les capteurs en or du QCM-D. Comme les revêtements L-PPE :N comportent des groupements amines primaires qui sont chargés lorsque mis en solution, l'adsorption d'une couche LbL initiale plus épaisse ($\sim 25\text{nm}$ vs

~7nm) mène à la formation d'un film plus épais. Il est toutefois intéressant de constater que malgré une épaisseur beaucoup plus importante, les valeurs de dissipation sont similaires pour les deux films (~15) confirmant le caractère rigide de ce dernier et la conformation compacte des molécules le composant.

Les résultats QCM-D montrent aussi par les courbes de dissipation obtenues que la combinaison [CS/COL] crée des films LbL très hydratés et viscoélastiques contrairement aux films [CS/CHI]. Ce phénomène pourrait être attribué à la conformation relâchée dans laquelle les molécules de collagène sont adsorbées et qui permet au film de contenir une grande quantité d'eau, d'où son épaisseur beaucoup plus importante que celle du film [CS/CHI].

Les résultats d'angle de contact montrent quant à eux une alternance de l'angle pour tous les films suggérant un changement de nature de la couche supérieure du film après chaque dépôt. Ce comportement est toutefois plus marqué pour le film contenant du COL. En effet, les variations d'angle de contact pour celui-ci se situent en moyenne autour de 26° tandis que pour les films [CS/CHI], elles se trouvent plutôt autour de 10°. Ce phénomène peut s'expliquer entre autre par le fait que le CHI est une substance plutôt hydrophile (Rinaudo, 2006) par rapport au COL et que son hydrophobicité se rapproche probablement plus de celle du CS. On observe aussi que les valeurs d'angle de contact sont semblables pour les deux films [CS/CHI] caractérisés sur L-PPE :N et verre aminé. Ces résultats portent à croire que la composition des couches est semblable, peu importe le substrat utilisé. Par contre, il est intéressant de constater que les valeurs d'angle de contact pour les couches de CS sont assez différentes lorsqu'il forme un film avec le CHI (entre 25° et 55°) ou le COL (entre 50° et 80°). Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs facteurs. Tout d'abord, il est possible que les couches soient légèrement interpénétrantes ce qui pourrait affecter les valeurs d'angle de contact. Par exemple, pour le film [CS/COL], il est possible qu'une partie des couches de CS soient composées de COL et vice versa pour les couches de COL. Cette hypothèse concorderait d'ailleurs avec les résultats de croissance des VSMC. Ils montrent un taux d'adhésion et de croissance très similaire pour les films [CS/COL]₃ et [CS/COL]₂-CS bien

que le CS, contrairement au COL, ne soit pas particulièrement reconnu pour ses propriétés pro-adhésives, tel qu'exposé dans la revue de littérature (section 1.4.1). Les images de phase de même que les images topographiques obtenues par AFM suggèrent toutefois qu'il y a une différence de composition entre les couches [CS/COL]₃ et [CS/COL]₂-CS. Ainsi, même s'il peut y avoir interpénétration des couches, il est probable que, la couche supérieure du film soit tout de même composée en grande partie du polyélectrolyte déposé. Enfin, la différence de rugosité entre les deux types de surfaces, tel qu'observée par AFM, pourrait être responsable de certaines des variations au niveau des angles de contact, ce paramètre étant reconnu pour influencer les mesures de ce type (Decker et al., 1999). Les résultats d'AFM montrent en effet une différence de rugosité entre les films [CS/CHI] et [CS/COL] (4,60nm vs 9,98nm). L'AFM a également permis de constater l'uniformité de la structure sur chaque échantillon (images topographiques) et l'uniformité de composition des surfaces (images de phase).

Le troisième sous-objectif consistait à démontrer la capacité du film LbL à relarguer des molécules d'intérêt comme le bFGF. Le développement du film [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃ a tout d'abord permis de constater la nécessité des couches de base [CS/CHI] avant les couches [CS/bFGF], afin de permettre un renversement de charge et par conséquent, la construction du film. Il est également possible d'observer que le nombre de couches de [CS/bFGF] pouvant être créé est limité, ce qui restreint par la même occasion la concentration en facteur de croissance présente dans le film. Cependant, le dépôt de nouvelles couches [CS/COL] est par la suite possible ce qui pourrait permettre la formation de structures périodiques contenant plusieurs étages de [CS/bFGF].

Les expériences par ELISA ont montré qu'il était possible d'obtenir un relargage à partir des films [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂ et [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃, mais que les quantités de facteurs de croissance relarguées pour un échantillon de 10 X 10 mm sont plutôt faibles.

En effet, la quantité de bFGF relarguée par le film se situe autour de 4 ng et s'effectue principalement durant les 24 premières heures. Ceci correspond à une efficacité d'environ

0,16% puisque ce résultat a été obtenu à partir d'une solution de fabrication contenant en tout 2,5µg de bFGF. L'augmentation de la concentration de bFGF (de 1µg/ml à 5µg/ml) ne permet pas d'augmenter très significativement la quantité de bFGF contenue dans les films LbL. Certaines études montrent d'ailleurs que pour une structure semblable à la nôtre, de très grandes concentrations de bFGF semblent nécessaires pour avoir une concentration raisonnable de facteur de croissance dans le film (Almodovar et al., 2010; Ma et al., 2007; Shah et al., 2011). Cependant, une telle augmentation de la concentration en facteur de croissance augmenterait de manière significative le coût du revêtement et ne serait donc pas une solution viable dans le cas présent. Il est important de souligner qu'il est possible que les quantités de facteurs de croissance mesurées ne soient pas représentatives de ce que contient réellement les LbL. En effet, dans les conditions testées, il est probable que seul le bFGF libéré par diffusion soit détecté. Ainsi, même après le processus de libération, il est possible qu'une certaine quantité de bFGF soit toujours prisonnière du LbL et qu'elle ne puisse être libérée que par la dégradation du film, qui ne peut s'effectuer dans les conditions testées. Cette dégradation ne pourrait avoir lieu qu'en présence d'enzymes comme la chondroïtinase.

Ce problème serait possiblement contournable en créant une structure périodique où des couches de [CS/COL] seraient intercalées entre des couches [CS/bFGF]. Par exemple, une structure du type [CS/bFGF/CS/COL]_n ou [CS/bFGF/CS/CHI]_n rendrait potentiellement possible la fabrication d'un grand nombre de couches étant donné la structure périodique qui rendrait possible un processus de renversement de charge plus efficace. Cette stratégie permettrait donc d'augmenter la quantité de facteurs de croissance contenus dans le film sans avoir à augmenter les concentrations de la solution de fabrication. Cette solution nécessiterait toutefois une automatisation du processus LbL étant donné que le nombre de couches nécessaires est assez grand (~50 couches ou plus tel que vu par Hammond et col. (Macdonald et al., 2011; Macdonald et al., 2010; Shah et al., 2011)). Toujours dans l'optique d'augmenter la concentration de facteur de croissance dans le film, une solution un peu différente, mais prometteuse pourrait être la fabrication du revêtement sur des nanoparticules. Cette solution permettrait tout simplement d'ajuster la quantité de facteurs de croissance relargués en ajustant la quantité de nanoparticules (Go et al., 2011). De plus, cette technique permettrait

en partie de pallier à l'une des limites du revêtement dans l'optique d'une application clinique : la stérilisation. Il serait probablement plus facile de fabriquer les nanoparticules dans un milieu stérile éliminant la nécessité de stériliser le film après sa fabrication.

Après avoir optimisé la concentration de bFGF dans le film, des essais de relargage au cours du temps seraient nécessaires afin d'étudier et d'améliorer la cinétique, car selon les résultats de survie des VSMC, une concentration de 10 ng/ml devrait être maintenue pendant 5 jours afin d'avoir un effet sur les cellules. Or nous avons vu avec le LBL étudié que la grande majorité du bFGF était relargué très rapidement en moins de 24h. Tel qu'exposé dans la section 1.3.4.3, un relargage rapide au début du processus pouvant être associé à un mécanisme de relargage par diffusion est plutôt commun avec l'utilisation de molécules de faible poids comme les facteurs de croissance (Macdonald et al., 2010; Pavlukhina et Sukhishvili, 2011; Shah et al., 2011; Ye et al., 2013). Plusieurs options existent pour ralentir ce processus tel que la réticulation des couches supérieures (Go et al., 2011).

La concentration de bFGF nécessaire pour influencer le comportement cellulaire a été déterminée par des essais *in vitro* avec le facteur de croissance en solution. Celui-ci montre un effet significatif du bFGF après 5 jours de survie en milieu sans sérum, pour toutes les concentrations testées (10 à 60 ng/ml). L'effet du bFGF sur les VSMC concorde avec la littérature qui indique que ce facteur de croissance a la capacité de favoriser la formation de tissus organisés (Kajimoto et al., 2008; Kusanagi et al., 2007; van der Bas et al., 2002; van der Bas et al., 2004). La concentration 20ng/ml a obtenu les résultats de survie les plus élevés (~90% de survie vs 58% pour le contrôle négatif). Toutefois, aucune différence significative entre cette condition et les autres concentrations testées n'a été trouvée, de même que pour le contrôle positif (10 ng/ml EGF). Il est donc raisonnable de penser qu'une concentration de bFGF de 10 ng/ml serait suffisante (80% de survie vs 58%), ce qui permettrait de réduire les coûts associés au revêtement. Cela suggère qu'il faudrait une concentration de 10 ng/ml dans les tissus autour de l'implant afin d'avoir un effet similaire à celui observé ici. Il est cependant, difficile d'extrapoler ces résultats *in vitro* pour déterminer les concentrations

requis *in vivo* dans un milieu où le bFGF pourrait se diluer et où d'autres biomolécules sont présentes.

Le quatrième et dernier sous-objectif consistait à démontrer *in vitro* la capacité du film à améliorer l'adhésion, la croissance et la survie des VSMC. Des tests d'adhésion et de croissance ont été effectués sur différents contrôles et surfaces LbL sans facteur de croissance et montrent que les films LbL [CS/COL] permettent adéquatement l'adhésion et la croissance des VSMC. Au contraire, les films LbL [CS/CHI] ne permettent pas une adhésion adéquate des VSMC lorsque le milieu d'incubation ne contient pas de sérum (donc pas de protéines). Notre hypothèse que l'ajout de couches [CS/COL] permettrait d'améliorer l'adhésion cellulaire s'avère juste puisque de toutes les surfaces testées, l'adhésion en milieu sans sérum des VSMC semble être optimale pour ce type de surface. Une observation au microscope des cellules colorées montre que dans ces conditions, elles ont une forme étalée après seulement 4 heures d'adhésion; contrairement aux surfaces contenant du CHI, sur lesquelles il y a très peu de cellules et sur les surfaces de verre aminé, sur lesquelles les cellules ont une forme plutôt ronde, indiquant une adhésion beaucoup moins marquée.

Il est intéressant d'observer que dans la littérature, certaines équipes trouvent une relativement bonne adhésion et croissance de cellules sur les films LbL à base de CHI (Liu, He et Gao, 2005) alors que d'autre constatent, comme nous, que l'effet sur les cellules peut être limité (Aggarwal et Groth, 2014). Le chitosane lui-même est généralement reconnu pour être plutôt pro-adhésif pour les cellules (Dutta, Dutta et Tripathi, 2004). Nos résultats s'expliquent sans doute en grande partie par le fait que l'adhésion sur le CHI passe essentiellement par l'adsorption de protéines adhésives à la surface, qui est stimulée par les groupements NH_3^+ . Ainsi, dans des conditions d'adhésion où les protéines sont absentes, c'est-à-dire en milieu sans sérum, l'adhésion sur le CHI est plus difficile tel que montré par les résultats. De plus, bien que le CS possède des propriétés anti-apoptotiques intéressantes pour les VSMCs (Laplanche et al., 2005; Raymond et al., 2004), des travaux au laboratoire ont récemment montré que CS seule ne favorise pas non plus l'adhésion cellulaire en absence de sérum (Thalla et al., 2014). Le COL au contraire, tel qu'exposé dans la section revue de

littérature (section 1.4.1), comporte des sites reconnus par les intégrines permettant de favoriser l'adhésion cellulaire d'une manière spécifique (Gribova, Auzely-Velty et Picart, 2012; White et al., 2004). Dans les conditions testées, l'absence de sérum n'empêche donc pas l'adhésion des VSMC contrairement aux films avec du CHI. Il est à remarquer que la rugosité des surfaces peut aussi avoir un impact sur le comportement des cellules. Généralement, les surfaces rugueuses favorisent l'adhésion des cellules et selon les images topographiques obtenues par AFM, le film [CS/COL]₃ possède une rugosité supérieure au film [CS/CHI]₃ (9,98 nm vs 4,60 nm). Finalement, il est aussi intéressant de constater que bien que les surfaces rigides favorisent généralement l'adhésion et la prolifération des cellules (Schneider et al., 2006), dans le cas présent, les films les plus viscoélastiques, soit les films LbL contenant du COL, ont permis une adhésion et une croissance meilleure que pour les films plus rigides contenant du CHI.

Comme [CS/CHI] ne semble pas générer le comportement désiré chez les VSMC, les couches de base des films contenant des facteurs de croissance auraient sans doute pu être remplacées par des couches [CS/COL] qui elles, permettent une excellente adhésion et croissance cellulaire, ce qui aurait simplifié la structure du film. Toutefois plusieurs points sont à considérer :

- Le CHI possède une densité de charge plus élevée que le COL ce qui permet sans doute une plus grande adsorption de bFGF dans le film.
- Le CHI nécessite l'utilisation d'un pH moins acide pour la fabrication du film ce qui permet l'obtention d'un film plus rigide qu'avec le COL (ce qui est confirmé par les résultats QCM-D qui indiquent que le remplacement du CHI par le COL produit un film nettement plus viscoélastique). Or, tel que mentionné plus tôt, la croissance cellulaire sur les films LbL est favorisée par un film rigide (Schneider et al., 2006)
- Le CHI coûte beaucoup moins cher que le COL

La dernière étape de ce projet consistait à évaluer l'adhésion et la survie des VSMC sur les LbL contenant le facteur de croissance, afin d'évaluer l'effet combiné du substrat LbL à base de COL, soit [CS/COL]₃, et du bFGF en solution sur la survie des VSMC. Même si le

relargage de bFGF à partir du LbL n'est pas au point, il aurait été intéressant de tester la combinaison décrite ici afin de déterminer si une fois optimisé, le film proposé pourrait avoir un effet sur la survie VSMC. Cette étape n'a malheureusement pas pu être effectuée, à cause d'une contamination des cellules par des mycoplasmes qui ont mené à des résultats anormaux durant plusieurs mois puis ont nécessité de jeter les cellules et tous les résultats obtenus.

En plus d'optimiser le relargage de bFGF à l'aide d'une nouvelle structure, tel que décrit plus tôt, plusieurs éléments vaudraient la peine d'être testés ou ajustés lors de projets futurs. Par exemple, certaines propriétés des revêtements tels que leur résistance lors de la pose d'une EC de même que leur résistance à la stérilisation pourraient être intéressantes à étudier. De plus, les revêtements pourraient être testés sur des substrats réels comme le PET tissé avec L-PPE :N. Ce dernier permettrait de créer un revêtement LbL qui pourrait être utilisé sur une variété de substrats.

Le présent projet comporte plusieurs limites. Mis à part celles qui sont directement liées aux techniques de mesure utilisées, l'une des principales limites du film conçu réside dans son incapacité à relarguer efficacement une quantité appréciable de bFGF. Tel qu'il a été mentionné plus tôt, la proportion de facteurs de croissance intégrée dans le film, par rapport à la concentration de la solution de fabrication, est faible et les bénéfices potentiels du LBL sont limités par cette trop faible concentration de bFGF. Bien que la technique du LbL comporte de nombreux avantages, il est évident ici qu'elle n'est pas aussi efficace pour la formation de films à partir d'un couple de polyélectrolytes ayant des poids moléculaires et des densités de charge très différents. Cette disparité empêche potentiellement la fabrication d'un grand nombre de couches [CS/bFGF] sans l'intervention de couches intermédiaires qui permettraient un renversement de charge efficace. De plus, il est difficile d'estimer les concentrations de bFGF qui seraient requises *in vivo* afin d'avoir un effet sur la guérison des tissus environnants. Ensuite, une autre limite de ce projet consiste en la quantité d'échantillons testés qui fut limitée pour des raisons de temps et de coût. Par exemple, la fabrication des films LbL à l'aide de différentes conditions de pH et différentes

concentrations ioniques pourrait mener à la fabrication d'un film possédant de meilleures propriétés. Finalement, étant donné le coût du bFGF, la majorité de la caractérisation a été menée sur les films [CS/CHI] et [CS/COL] fabriqués séparément sur des substrats de verre aminé. Bien qu'il y ait de bonnes raisons de croire que les différentes parties du film L-PPE :N - [CS/CHI]₃-[CS/bFGF]₂-[CS/COL]₃ aurait des propriétés semblables à celles des films testés, une caractérisation plus en profondeur de ce LbL devrait être effectuée.

CONCLUSION

Le but de ce projet était l'amélioration de l'adhésion et de la prolifération des VSMC par le biais d'un film LbL afin d'ultimement améliorer les résultats cliniques après EVAR en permettant la guérison du vaisseau sanguin autour de l'EC.

Pour ce faire, plusieurs revêtements ont été développés tel que [CS/CHI], [CS/COL], [CS/CHI]-[CS/bFGF] et [CS/CHI]-[CS/bFGF]-[CS/COL]. Ces films ont été caractérisés par QCM-D, ellipsométrie, angle de contact et AFM. Les performances des films ont finalement été caractérisées par ELISA et par différentes expériences de culture cellulaire sur les VSMC comme la survie, l'adhésion et la croissance.

En premier lieu, la capacité des molécules choisies, soit CS, CHI, COL et bFGF, à former un film LbL a été démontré avec succès. Les résultats obtenus montrent une croissance des films régulière et répétable de même qu'une structure de type LbL. La quantité de couches successives formées avec le facteur de croissance bFGF reste cependant limitée, à cause d'un renversement de charge inadéquat. Une structure périodique pourrait toutefois permettre de passer outre cette limitation. Deuxièmement, la possibilité de former un film LbL en utilisant un revêtement L-PPE :N comme substrat a été prouvée. Ainsi, les revêtements créés pourraient facilement être transférables sur des EC ou sur une variété de substrat. Les résultats obtenus sont semblables à ceux générés avec les films sur verre aminé. Troisièmement, plusieurs étapes ont été franchies pour étudier la capacité des films à améliorer la survie, l'adhésion et la croissance des VSMC. Il a été trouvé qu'une concentration de 10ng/ml de bFGF en solution est suffisante pour améliorer la survie des VSMC après 5 jours de culture. Les résultats ELISA ont montrés que les films LbL développés ont la capacité de relarguer le facteur de croissance qu'il contient, soit le bFGF, mais que la quantité et le profil de relargage doivent être améliorés. Par contre, les films LbL contenant du COL semblent très efficaces pour favoriser l'adhésion, même en l'absence de sérum, et la croissance des cellules.

Ainsi, bien qu'une preuve de concept ait été établie, plusieurs éléments vaudraient la peine d'être testés ou ajustés lors de projets futurs :

- Augmenter la concentration en bFGF et ajuster le profil de relargage via plusieurs options telles que :
 - La périodisation des couches en utilisant un polymère synthétique et en augmentant le nombre de couches. Il serait possible de choisir un polymère avec une haute densité de charge, ce qui permettrait un renversement de charge efficace et donc une bonne adsorption des couches subséquentes. De plus, les polymères comme les polyβaminoester, qui sont hydrolysables à un pH autour de la neutralité, pourraient permettre d'améliorer le profil de relargage et même d'éliminer le besoin d'activités enzymatiques pour la dégradation du LbL (Macdonald et al., 2010).
 - Le transfert sur des nanoparticules. La quantité de facteurs de croissance serait, dans ce cas, directement ajustable via la quantité de nanoparticules utilisées.
- Tester les revêtements sur des substrats réels comme le PET tissé avec L-PPE :N
- Tester certaines propriétés du revêtement tel que sa résistance lors de la pose d'une EC de même que sa résistance à la stérilisation

ANNEXE I

RÉSULTATS DES TESTS D'ÉTENDUE MULTIPLE POUR LES ESSAIS DE CULTURE CELLULAIRE

Tableau - A I- 1 Test d'étendue multiple pour les résultats de survie après 5 jours en présence de bFGF en solution

Contraste	Sig.	Différence	+/- limites
Sans sérum - bFGF 10 ng/ml	*	-21,5408	15,6404
Sans sérum - bFGF 20 ng/ml	*	-32,5832	15,6404
Sans sérum - bFGF 30 ng/ml	*	-29,9773	15,6404
Sans sérum - bFGF 60 ng/ml	*	-25,0784	15,6404
Sans sérum - EGF 10 ng/ml	*	-22,1597	15,6404
bFGF 10 ng/ml - bFGF 20 ng/ml		-11,0424	15,6404
bFGF 10 ng/ml - bFGF 30 ng/ml		-8,43652	15,6404
bFGF 10 ng/ml - bFGF 60 ng/ml		-3,53755	15,6404
bFGF 10 ng/ml - EGF 10 ng/ml		-0,61886	15,6404
bFGF 20 ng/ml - bFGF 30 ng/ml		2,60591	15,6404
bFGF 20 ng/ml - bFGF 60 ng/ml		7,50488	15,6404
bFGF 20 ng/ml - EGF 10 ng/ml		10,4236	15,6404
bFGF 30 ng/ml - bFGF 60 ng/ml		4,89897	15,6404
bFGF 30 ng/ml - EGF 10 ng/ml		7,81766	15,6404
bFGF 60 ng/ml - EGF 10 ng/ml		2,91869	15,6404

Tableau - A I- 2 Test d'étendue multiple après 4 jours de croissance en milieu complet des VSMC sur différents revêtements

Contraste	Sig.	Différence	+/- limites
[CS/CHI]3 - [CS/CHI]2-CS		-87,4455	306,456
[CS/CHI]3 - [CS/COL]3	*	-3288,01	322,263
[CS/CHI]3 - [CS/COL]2-CS	*	-3068,99	306,456
[CS/CHI]3 - Verre aminé	*	-2695,4	313,668
[CS/CHI]2-CS - [CS/COL]3	*	-3200,57	315,248
[CS/CHI]2-CS - [CS/COL]2-CS	*	-2981,55	299,071
[CS/CHI]2-CS - Verre aminé	*	-2607,95	306,456
[CS/COL]3 - [CS/COL]2-CS		219,02	315,248
[CS/COL]3 - Verre aminé	*	592,611	322,263
[CS/COL]2-CS - Verre aminé	*	373,591	306,456

Tableau - A I- 3 Test d'étendue multiple après 7 jours de croissance en milieu complet des VSMC sur différents revêtements

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Différence</i>	<i>+/- limites</i>
[CS/CHI]3 - [CS/CHI]2-CS		-306,917	576,389
[CS/CHI]3 - [CS/COL]3	*	-3375,52	589,343
[CS/CHI]3 - [CS/COL]2-CS	*	-3126,95	604,522
[CS/CHI]3 - Verre aminé	*	-2227,33	576,389
[CS/CHI]2-CS - [CS/COL]3	*	-3068,61	589,343
[CS/CHI]2-CS - [CS/COL]2-CS	*	-2820,03	604,522
[CS/CHI]2-CS - Verre aminé	*	-1920,42	576,389
[CS/COL]3 - [CS/COL]2-CS		248,573	616,885
[CS/COL]3 - Verre aminé	*	1148,19	589,343
[CS/COL]2-CS - Verre aminé	*	899,617	604,522

ANNEXE II

TEST ELISA PRÉLIMINAIRE

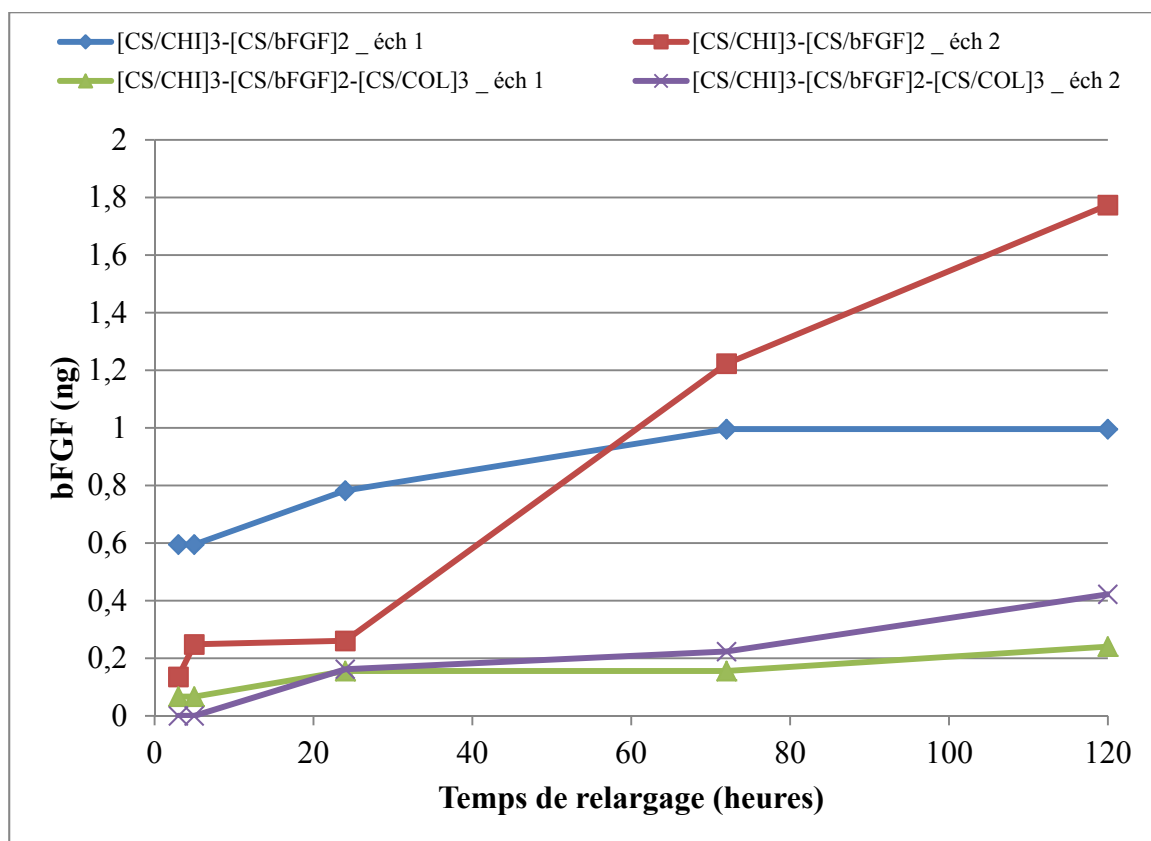


Figure - A II - 1 Résultats ELISA des tests de relargage préliminaires

ANNEXE III

COMPARAISON DES MODÈLES ALTERNATIFS DE RÉGRESSION

<i>Modèle</i>	<i>Corrélation</i>	<i>R-carré</i>
Linéaire	0,9196	84,57%
Racine carrée Y et X	0,9186	84,39%
Y carré, X carré	0,9170	84,08%
Multiplicatif	0,9162	83,94%
X carré	0,9131	83,37%
Racine carrée Y	0,9100	82,80%
Racine carrée Y, log X	0,9031	81,55%
Racine carrée X	0,9027	81,49%
Log Y, racine carrée X	0,8962	80,31%
Réciproque double	0,8805	77,52%
Y carré	0,8708	75,84%
Racine carrée Y, X carré	0,8673	75,21%
Log X	0,8585	73,70%
Exponentiel	0,8583	73,66%
Courbe en S	-0,8561	73,28%
Y carré, racine carrée X	0,8212	67,43%
Log Y, X carré	0,7784	60,60%
Y carré, log X	0,7442	55,38%

Tableau - A III - 3 Comparaison des modèles
alternatifs pour le film [CS/CHI] sur un substrat d'or

Modèle	Corrélation	R-carré
Racine carrée Y	0,7465	55,72%
X carré	0,7450	55,51%
Linéaire	0,7445	55,42%
Exponentiel	0,7430	55,21%
Racine carrée Y, X carré	0,7417	55,01%
Y carré, X carré	0,7384	54,53%
Racine carrée Y et X	0,7350	54,02%
Log Y, racine carrée X	0,7345	53,95%
Log Y, X carré	0,7329	53,71%
Racine carrée X	0,7302	53,31%
Y carré	0,7276	52,94%
Réciproque Y	-0,7170	51,40%
Multiplicatif	0,7124	50,75%
Racine carrée Y, log X	0,7101	50,42%
Y carré, racine carrée X	0,7081	50,14%
Log X	0,7026	49,37%
Réciproque Y, X carré	-0,6968	48,55%
Y carré, log X	0,6760	45,69%

Tableau - A III - 4 Comparaison des modèles alternatifs pour le film [CS/COL] sur un substrat d'or

Modèle	Corrélation	R-carré
Y carré, X carré	0,7429	55,19%
X carré	0,7338	53,85%
Racine carrée Y, X carré	0,7235	52,34%
Y carré	0,7133	50,88%
Linéaire	0,7117	50,65%
Log Y, X carré	0,7083	50,18%
Racine carrée Y	0,7055	49,77%
Exponentiel	0,6948	48,28%
Racine carrée X	0,6913	47,79%
Y carré, racine carrée X	0,6890	47,47%
Racine carrée Y et X	0,6873	47,24%
Log Y, racine carrée X	0,6791	46,12%
Log X	0,6643	44,12%
Racine carrée Y, log X	0,6625	43,89%
Réciproque Y, X carré	-0,6624	43,87%
Y carré, log X	0,6583	43,34%
Réciproque Y	-0,6583	43,33%
Multiplicatif	0,6568	43,14%
Racine carrée Y, réciproque X	-0,5993	35,91%
Courbe en S	-0,5979	35,75%

Tableau - A III - 5 Comparaison des modèles
alternatifs pour les couches CS du film [CS/COL]

Modèle	Corrélation	R-carré
Racine carrée Y	0,8459	71,56%
Exponentiel	0,8457	71,52%
Log Y, racine carrée X	0,8451	71,42%
Linéaire	0,8425	70,98%
Racine carrée Y et X	0,8417	70,84%
Racine carrée X	0,8346	69,66%
Réciproque Y	-0,8335	69,48%
Multiplicatif	0,8266	68,33%
Y carré	0,8258	68,19%
X carré	0,8218	67,53%
Racine carrée Y, log X	0,8196	67,18%
Racine carrée Y, X carré	0,8189	67,06%
Y carré, X carré	0,8176	66,84%
Log Y, X carré	0,8124	66,00%
Y carré, racine carrée X	0,8110	65,77%
Log X	0,8091	65,47%
Réciproque Y, X carré	-0,7888	62,23%
Y carré, log X	0,7791	60,70%
Réciproque double	0,7582	57,48%
Courbe en S	-0,7445	55,43%
Racine carrée Y, réciproque X	-0,7322	53,61%
Réciproque X	-0,7167	51,37%

Tableau - A III - 6 Comparaison des modèles alternatifs pour les couches COL du film [CS/COL]

Modèle	Corrélation	R-carré
Linéaire	0,7946	63,14%
Racine carrée Y et X	0,7937	62,99%
Racine carrée X	0,7907	62,53%
Racine carrée Y, log X	0,7839	61,44%
Racine carrée Y	0,7837	61,41%
Multiplicatif	0,7811	61,02%
Y carré, X carré	0,7755	60,15%
Y carré	0,7730	59,75%
Log Y, racine carrée X	0,7699	59,27%
X carré	0,7686	59,08%
Log X	0,7642	58,39%
Y carré, racine carrée X	0,7498	56,21%
Exponentiel	0,7436	55,29%
Racine carrée Y, X carré	0,7398	54,74%
Courbe en S	-0,7358	54,14%
Réciproque double	0,7111	50,57%
Y carré, log X	0,7023	49,32%
Log Y, X carré	0,6812	46,40%
Réciproque X	-0,6455	41,66%
Réciproque Y	-0,5535	30,64%
Y carré, réciproque X	-0,5519	30,46%
Réciproque Y, X carré	-0,4681	21,91%

Tableau - A III - 7 Comparaison des modèles alternatifs le film [CS/CHI] sur un substrat de L-PPE :N

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggarwal, N., et T. Groth. 2014. « Multilayer films by blending heparin with semisynthetic cellulose sulfates: Physico-chemical characterization and cell responses ». *J Biomed Mater Res A*.
- Akers, D. L. , et M. D. Kerstein. 2014. « Aneurysm ». In *Access Science*. < <http://www.accessscience.com/abstract.aspx?id=034100&referURL=/content/Aneurysm/034100> >.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the cell*. New York (NY): Garland Publishing, 1293 p.
- Almodovar, J., L. W. Place, J. Gogolski, K. Erickson et M. J. Kipper. 2011. « Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers: a spectroscopic study of hydrophilicity, composition, and ion pairing ». *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 7, p. 2755-65.
- Almodovar, Jorge , Samantha Bacon, Jarrod Gogolsk, John D. Kisiday et Matt J. Kipper. 2010. « Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Multilayer Surface Coatings can Enhance Mesenchymal Stem Cell Response to Adsorbed Growth Factors ». *Biomacromolecules*, vol. 11, p. 2629–2639.
- Arko, F. R., 3rd, E. H. Murphy, C. Boyes, T. Nussbaum, S. G. Lalka, J. Holleman et T. S. Roush. 2012. « Current status of endovascular aneurysm repair: 20 years of learning ». *Semin Vasc Surg*, vol. 25, n° 3, p. 131-5.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem et M. Tomic-Canic. 2008. « Growth factors and cytokines in wound healing ». *Wound Repair Regen*, vol. 16, n° 5, p. 585-601.
- Basmanav, F. B., G. T. Kose et V. Hasirci. 2008. « Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering ». In *Biomaterials*. Vol. 29, p. 4195-204. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691753> >.
- Boddohi, S., C. E. Killingsworth et M. J. Kipper. 2008. « Polyelectrolyte Multilayer Assembly as a Function of pH and Ionic Strength Using the Polysaccharides Chitosan and Heparin ». *Biomacromolecules*, vol. 9, p. 2021-2028.
- Boddohi, S., et M. J. Kipper. 2010. « Engineering nanoassemblies of polysaccharides ». *Adv Mater*, vol. 22, n° 28, p. 2998-3016.

- Bothwell, M. 2012. « Growth factor ». In *AccessScience*. McGraw-Hill Education. < <http://www.accessscience.com/content/Growth-factor/301750> >.
- Boucher, C., J. C. Ruiz, M. Thibault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur, Y. Durocher et G. De Crescenzo. 2010. « Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions ». In *Biomaterials*. Vol. 31, p. 7021-31. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579729> >.
- Boudou, T., T. Crouzier, R. Auzely-Velty, K. Glinel et C. Picart. 2009. « Internal composition versus the mechanical properties of polyelectrolyte multilayer films: the influence of chemical cross-linking ». *Langmuir*, vol. 25, n° 24, p. 13809-19.
- Boudou, T., T. Crouzier, K. Ren, G. Blin et C. Picart. 2010. « Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications ». *Adv Mater*, vol. 22, n° 4, p. 441-67.
- Boura, C., P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller et J. F. Stoltz. 2003. « Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification ». *Biomaterials*, vol. 24, n° 20, p. 3521-3530.
- Bowen, W. R., et N. Hilal. 2009. *Atomic Force Microscopy in Process Engineering - An Introduction to AFM for Improved Processes and Products*. Butterworth-Heinemann, 101 p.
- Brickmann, J., H. Notbohm et P.K. Müller. 2005. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. Coll. « Topics in current chemistry ». Berlin, 257 p.
- Brodsky, B. 2012. « Collagen ». In *AccessScience*. McGraw-Hill Education. < <http://www.accessscience.com/content/Collagen/148600> >.
- Brynda, E., J. Pachernik, M. Houska, Z. Pientka et P. Dvorak. 2005. « Surface Immobilized Protein Multilayers for Cell Seeding ». *Langmuir*, n° 21, p. 7877-7883.
- Charbonneau, C., B. Liberelle, M. J. Hebert, G. De Crescenzo et S. Lerouge. 2011. « Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating ». *Biomaterials*, vol. 32, n° 6, p. 1591-600.
- Charbonneau, C., J. C. Ruiz, P. Lequoy, M. J. Hebert, G. De Crescenzo, M. R. Wertheimer et S. Lerouge. 2012. « Chondroitin sulfate and epidermal growth factor immobilization after plasma polymerization: a versatile anti-apoptotic coating to promote healing around stent grafts ». *Macromol Biosci*, vol. 12, n° 6, p. 812-21.
- Chaubaroux, C., E. Vrana, C. Debry, P. Schaaf, B. Senger, J. C. Voegel, Y. Haikel, C. Ringwald, J. Hemmerle, P. Lavalley et F. Boulmedais. 2012. « Collagen-based fibrillar

- multilayer films cross-linked by a natural agent ». *Biomacromolecules*, vol. 13, n° 7, p. 2128-35.
- Choi, J., et M. F. Rubner. 2005. « Influence of the Degree of Ionization on Weak Polyelectrolyte Multilayer Assembly ». *Macromolecules*, vol. 38, p. 116-124.
- Chu, P.K., J.Y. Chen, L.P. Wang et N. Huang. 2002. « Plasma-surface modification of biomaterials ». *Reports: A review journal*, vol. 36, p. 143-206.
- Cima, LG, JP Vacanti, C Vacanti, D. Ingber, D. Mooney et R Langer. 1991. « Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates ». *Journal of biomechanical engineering*, vol. 113, n° 2, p. 143-151.
- Costa, R. R., C. A. Custodio, F. J. Arias, J. C. Rodriguez-Cabello et J. F. Mano. 2011. « Layer-by-layer assembly of chitosan and recombinant biopolymers into biomimetic coatings with multiple stimuli-responsive properties ». *Small*, vol. 7, n° 18, p. 2640-9.
- Crespilho, F. N., et R. M. Iost. 2012. « Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics ». In *Biosens Bioelectron*. Vol. 31, p. 1-10. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154167> >.
- Croll, Tristan I. , Andrea J. O'Connor, Geoffrey W. Stevens et Justin J. Cooper-White. 2006. « A Blank Slate? Layer-by-Layer Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan onto Various Surfaces ». *Biomacromolecules*, vol. 7, p. 1610-1622.
- Crouzier, T., K. Ren, C. Nicolas, C. Roy et C. Picart. 2009. « Layer-by-layer films as a biomimetic reservoir for rhBMP-2 delivery: controlled differentiation of myoblasts to osteoblasts ». *Small*, vol. 5, n° 5, p. 598-608.
- Dangas, G., D. O'Connor, B. Firwana, S. Brar, S. Ellozy, A. Vouyouka, M. Arnold, C. E. Kosmas, P. Krishnan, J. Wiley, J. Suleman, J. Olin, M. Marin et P. Faries. 2012. « Open versus endovascular stent graft repair of abdominal aortic aneurysms: a meta-analysis of randomized trials ». *JACC Cardiovasc Interv*, vol. 5, n° 10, p. 1071-80.
- Decher, G., Y. Lvov et J. Schmitt. 1994. « Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films ». *Thin solid films*, vol. 244, p. 772-777.
- Decker, E.L., B. Frank, Y. Suo et S. Garoff. 1999. « Physics of contact angle measurement ». *Colloids and surfaces A*, vol. 156, p. 177-189.
- Delrieu, I. . 2000. « The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism ». *FEBS Letters*, vol. 468, p. 6-10.

- Denuzziere, A., D. Ferrier et A. Domard. 1996. « Chitosan-Chondroitin sulfate and chitosan hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects ». *Carbohydrate polymers*, n° 29, p. 317-323.
- Detzel, C.J., A.L. Larkins et P. Rajagopalan. 2011. « Polyelectrolyte multilayers in tissue engineering ». *Tissue engineering: Part B*, vol. 17, n° 2, p. 101-113.
- Dixon, M. C. . 2008. « Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions ». *Journal of Biomolecular Techniques 1*, vol. 19, p. 151-158.
- Dufrène, Y. F. 2012. « Atomic force microscopy ». In *AccessScience*, sous la dir. de Education, McGraw-Hill.
- Dutta, P. K., J. Dutta et V.S. Tripathi. 2004. « Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications ». *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 63, p. 20-31.
- Fu, J., J. Ji, W. Yuan et J. Shen. 2005. « Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan ». In *Biomaterials*. Vol. 26, p. 6684-92. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946736> >.
- Gigout, A., J. C. Ruiz, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur et S. Lerouge. 2011. « Nitrogen-rich plasma-polymerized coatings on PET and PTFE surfaces improve endothelial cell attachment and resistance to shear flow ». *Macromol Biosci*, vol. 11, n° 8, p. 1110-9.
- Go, D. P., S. L. Gras, D. Mitra, T. H. Nguyen, G. W. Stevens, J. J. Cooper-White et A. J. O'Connor. 2011. « Multilayered microspheres for the controlled release of growth factors in tissue engineering ». *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 5, p. 1494-503.
- Gong, Y., Y. Zhu, Y. Liu, Z. Ma, C. Gao et J. Shen. 2007. « Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly(L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis ». In *Acta Biomater*. Vol. 3, p. 677-85. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576103> >.
- Greenhalgh, R. M., et J. T. Powell. 2008. « Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm ». *The new england journal of medicine*, vol. 358, n° 5, p. 494-501.
- Gribova, V., R. Auzely-Velty et C. Picart. 2012. « Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering ». *Chemistry of Materials*, vol. 24, n° 5, p. 854-869.
- Guzmán, Eduardo, Hernán Ritacco, José E. F. Rubio, Ramón G. Rubio et Francisco Ortega. 2009. « Salt-induced changes in the growth of polyelectrolyte layers of poly(diallyl-

- dimethylammonium chloride) and poly(4-styrene sulfonate of sodium) ». *Soft Matter*, vol. 5, n° 10, p. 2130.
- Hammond, Paula T. 2011. « Engineering materials layer-by-layer: Challenges and opportunities in multilayer assembly ». *AIChE Journal*, vol. 57, n° 11, p. 2928-2940.
- He, Xianyun, Yingjun Wang et Gang Wu. 2012. « Layer-by-layer assembly of type I collagen and chondroitin sulfate on aminolyzed PU for potential cartilage tissue engineering application ». *Applied Surface Science*, vol. 258, n° 24, p. 9918-9925.
- Henderson, E. L., Y. J. Geng, G. K. Sukhova, A. D. Whittemore, J. Knox et P. Libby. 1999. « Death of Smooth Muscle Cells and Expression of Mediators of Apoptosis by T Lymphocytes in Human Abdominal Aortic Aneurysms ». *Circulation*, vol. 99, n° 1, p. 96-104.
- Himmelfarb, J., et L. Couper. 1997. « Dipyridamole inhibits PDGF- and bFGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation ». *International Society of Nephrology*, vol. 52, p. 1671-1677.
- Hinek, A., J. Boyle et M. Rabinovitch. 1992. « Vascular smooth muscle cell detachment from elastin and migration through elastic laminae is promoted by chondroitin sulfate-induced “shedding” of the 67-kDa cell surface elastin binding protein ». *Experimental Cell Research*, n° 2, p. 344-353.
- Höök, Fredrik, et Bengt Kasemo. 2007. « The QCM-D Technique for Probing Biomacromolecular Recognition Reactions ». vol. 5, p. 425-447.
- Hu, Y., K. Cai, Z. Luo, Y. Zhang, L. Li, M. Lai, Y. Hou, Y. Huang, J. Li, X. Ding, B. Zhang et K. L. Sung. 2012. « Regulation of the differentiation of mesenchymal stem cells in vitro and osteogenesis in vivo by microenvironmental modification of titanium alloy surfaces ». In *Biomaterials*. Vol. 33, p. 3515-28. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333987> >.
- Itoh, Y., M. Matsusaki, T. Kida et M. Akashi. 2008. « Locally Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Multilayered Capsules ». *Biomacromolecules*, vol. 9, p. 2202-2206.
- Jayakumar, R., M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair et H. Tamura. 2011. « Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications ». In *Biotechnol Adv.* Vol. 29, p. 322-37. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262336> >.
- Jeon, O., S. W. Kang, H. W. Lim, J. Hyung Chung et B. S. Kim. 2006. « Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly(L-

- lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel ». In *Biomaterials*. Vol. 27, p. 1598-607. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146647> >.
- Kajimoto, M., T. Shimono, K. Hirano, Y. Miyake, N. Kato, K. Imanaka-Yoshida, H. Shimpō et K. Miyamoto. 2008. « Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: a canine model experiment ». In *J Vasc Surg*. Vol. 48, p. 1306-14. United States. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639416> >.
- Khor, E., et L. Y. Lim. 2003. « Implantable applications of chitin and chitosan ». *Biomaterials*, vol. 24, n° 13, p. 2339-2349.
- Klitzing, R.V. . 2006. « Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies ». *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 8, n° 43, p. 5012-33.
- Knoll, W., et R. Advincula. 2011. *Functional polymer films, volume 1: preparation and patterning* Weinheim (Allemagne): Wiley-VCH.
- Kujawa, P., P. Moraille, J. Sanchez, A. Badia et F. M. Winnik. 2005. « Effect of Molecular Weight on the Exponential Growth and Morphology of Hyaluronan/Chitosan Multilayers: A Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Investigation ». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, p. 9224-9234.
- Kumar, S. 2012. « Textbook of Microbiology ». In., p. 779. Jaypee Brothers Medical Publishers. < <http://books.google.ca/books?id=iklds56O4EC&pg=PA160&dq=ELISA+AND+sandwich&hl=en&sa=X&ei=ksKwUu3LF8XAkQexm4C4Bw&ved=0CF8Q6AEwBjgK#v=onepage&q&f=false> >.
- Kusanagi, Miho, Osamu Matsui, Junichiro Sanada, Takahiro Ogi, Shigeyuki Takamatsu, Hongshan Zhong, Yu Kimura et Yasuhiko Tabata. 2007. « Hydrogel-Mediated Release of Basic Fibroblast Growth Factor From a Stent-Graft Accelerates Biological Fixation With the Aortic Wall in a Porcine Model ». *Journal of Endovascular Therapy*, vol. 14, p. 785-793.
- Lapante, P., M.A. Raymond, G. Gagnon, N. Vigneault, A.M.J. Sasseville, Y. Langelier, M. Bernard, Y. Raymond et M.J. Hébert. 2005. « Novel Fibrogenic Pathways Are Activated in Response to Endothelial Apoptosis: Implications in the Pathophysiology of Systemic Sclerosis ». *The Journal of Immunology*, vol. 174, p. 5740-5749.
- Laschewsky, A. , P. Bertrand, A. Jonas et R. Legras. 2000. « Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties ». *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 21, p. 319-348.

- Lee, C. H., A. Singla et Y. Lee. 2001. « Biomedical applications of collagen ». *International journal of pharmaceutics*, vol. 221, p. 1-22.
- Leguen, E., A. Chassepot, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel et N. Jessel. 2007. « Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs ». *Biomol Eng*, vol. 24, n° 1, p. 33-41.
- Lequoy, P., B. Liberelle, G. De Crescenzo et S. Lerouge. 2014. « Additive Benefits of Chondroitin Sulfate and Oriented Tethered Epidermal Growth Factor for Vascular Smooth Muscle Cell Survival ». *Macromolecular Bioscience*.
- Lerouge, S., A. Major, P. L. Girault-Lauriault, M. A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer et M. J. Hebert. 2007a. « Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair ». In *Biomaterials*. Vol. 28, p. 1209-17. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129601> >.
- Lerouge, S., A. Major, P. L. Girault-Lauriault, M. A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer et M. J. Hebert. 2007b. « Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair ». *Biomaterials*, vol. 28, n° 6, p. 1209-17.
- Liang, C. Z., H. Li, Y. Q. Tao, X. P. Zhou, Z. R. Yang, Y. X. Xiao, F. C. Li, B. Han et Q. X. Chen. 2012. « Dual delivery for stem cell differentiation using dexamethasone and bFGF in/on polymeric microspheres as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration ». *J Mater Sci Mater Med*, vol. 23, n° 4, p. 1097-107.
- Lin, Q., X. Ding, F. Qiu, X. Song, G. Fu et J. Ji. 2010. « In situ endothelialization of intravascular stents coated with an anti-CD34 antibody functionalized heparin-collagen multilayer ». In *Biomaterials*. Vol. 31, p. 4017-25. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149438> >.
- Liu, Y., T. He et C. Gao. 2005. « Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells ». *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 46, n° 2, p. 117-26.
- Liu, Y., T. He, H. Song et C. Gao. 2007. « Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 81, n° 3, p. 692-704.
- Lundin, M., F. Solaqa, E. Thormann, L. Macakova et E. Blomberg. 2011. « Layer-by-layer assemblies of chitosan and heparin: effect of solution ionic strength and pH ». *Langmuir*, vol. 27, n° 12, p. 7537-48.

- Lutolf, M. P., et J. A. Hubbell. 2005. « Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering ». In *Nat Biotechnol.* Vol. 23, p. 47-55. United States. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637621> >.
- Ma, L., J. Zhou, C. Gao et J. Shen. 2007. « Incorporation of basic fibroblast growth factor by a layer-by-layer assembly technique to produce bioactive substrates ». *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 83, n° 1, p. 285-92.
- Macdonald, M. L., R. E. Samuel, N. J. Shah, R. F. Padera, Y. M. Beben et P. T. Hammond. 2011. « Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants ». *Biomaterials*, vol. 32, n° 5, p. 1446-53.
- Macdonald, Mara L. , Natalia M. Rodriguez, Nisarg J. Shah et Paula T. Hammond. 2010. « Characterization of tunable FGF-2 releasing polyelectrolyte multilayers ». *Biomacromolecules*, vol. 11, p. 2053-2059.
- Major, Annie , Robert Guidoin, Gilles Soulez, Louis A. Gaboury, Guy Cloutier, Marc Sapoval, Yvan Douville, Guy Dionne, Robert H. Geelkerken, Paul Petrsek et Sophie Lerouge. 2006. « Implant Degradation and Poor Healing After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: An Analysis of Explanted Stent-Grafts ». *Journal of endovascular therapy*, vol. 13, p. 457-467.
- Marieb, Elaine Nicpon 2005. *Anatomie et physiologie humaine*, 3e ed. St-Laurent (Qué.): Éditions du renouveau pédagogique, 1288 p.
- Matsusaki, Michiya, Takeshi Serizawa, Akio Kishida et Mitsuru Akashi. 2005. « Novel Functional Biodegradable Polymer II: Fibroblast Growth Factor-2 Activities of Poly(γ -glutamic acid)-sulfonate ». *Biomacromolecules*, vol. 6, p. 400-407.
- Meng, S., Z. Liu, L. Shen, Z. Guo, L. L. Chou, W. Zhong, Q. Du et J. Ge. 2009. « The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system ». In *Biomaterials*. Vol. 30, p. 2276-83. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168214> >.
- Mhanna, R. F., J. Voros et M. Zenobi-Wong. 2011. « Layer-by-layer films made from extracellular matrix macromolecules on silicone substrates ». *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 3, p. 609-16.
- Mi, F. L., S. S. Shyu, C. K. Peng, Y. B. Wu, H. W. Sung, P. S. Wang et C. C. Huang. 2006. « Fabrication of chondroitin sulfate-chitosan composite artificial extracellular matrix for stabilization of fibroblast growth factor ». *J Biomed Mater Res A*, vol. 76, n° 1, p. 1-15.

- Mwale, F., S. Rampersad, J.-C. Ruiz, P.-L. Girard-Lauriault, A. Petit, J. Antoniou, S. Lerouge et M. R. Wertheimer. 2011. « Amine-Rich Cell-Culture Surfaces for Research in Orthopedic Medicine ». *Plasma Medicine*, vol. 1, n° 2, p. 115-133.
- Nikitovic, D., M. Assoutia, M. Sifaki, P. Katonisa, K. Krasagakisb, N.K. Karamanosc et G.N. Tzanakakis. 2007. « Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40, p. 72-83.
- Nordon, I.M., R.J. Hinchliffe, I.M. Loftus et M.M. Thompson. 2011. « Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms ». *Nature reviews, Cardiology*, vol. 8, n° 2, p. 92-102.
- Notley, S. M., M. Eriksson et L. Wagberg. 2005. « Visco-elastic and adhesive properties of adsorbed polyelectrolyte multilayers determined in situ with QCM-D and AFM measurements ». In *J Colloid Interface Sci.* Vol. 292, p. 29-37. United States. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15978604> >.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton et F. Pognan. 2000. « Investigation of alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assesment of mammalian cell cytotoxicity ». *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, n° 17, p. 5421-5426.
- Oliveira, Sara M., Tiago H. Silva, Rui L. Reis et João F. Mano. 2013. « Nanocoatings containing sulfated polysaccharides prepared by layer-by-layer assembly as models to study cell–material interactions ». *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, n° 35, p. 4406.
- Park, W., et K. Na. 2009. « Polyelectrolyte complex of chondroitin sulfate and peptide with lower pI value in poly(lactide-co-glycolide) microsphere for stability and controlled release ». *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 72, n° 2, p. 193-200.
- Parodi, J.C., J.C. Palmaz et H.D. Barone. 1991. « Transfemoral Intraluminal Graft Implantation for Abdominal Aortic Aneurysms ». *Annals of Vascular Surgery*, vol. 5, n° 6, p. 491-499.
- Pavinatto, Felipe J., Luciano Caseli et Osvaldo N. Oliveira. 2010. « Chitosan in Nanostructured Thin Films ». *Biomacromolecules*, vol. 11, n° 8, p. 1897–1908.
- Pavlukhina, S., et S. Sukhishvili. 2011. « Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces ». In *Adv Drug Deliv Rev.* Vol. 63, p. 822-36. Netherlands. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684313> >.
- Pearlman, R., et J. Wang. 1996. *Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs: Case Histories*, Springer. 432 p.

- Rahmany, M. B., et M. Van Dyke. 2013. « Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review ». *Acta Biomaterialia*, vol. 9, n° 3, p. 5431-7.
- Rampersad, S., J. C. Ruiz, A. Petit, S. Lerouge, J. Antoniou, M. R. Wertheimer et F. Mwale. 2011. « Stem cells, nitrogen-rich plasma-polymerized culture surfaces, and type X collagen suppression ». *Tissue Eng Part A*, vol. 17, n° 19-20, p. 2551-60.
- Ratner, B. D. , A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons. 2004. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego (Californie), 831 p.
- Raymond, M. A., A. Desormeaux, P. Laplante, N. Vigneault, J. G. Filep, K. Landry, A. V. Pshezhetsky et M. J. Hebert. 2004. « Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC ». *FASEB J*, vol. 18, n° 6, p. 705-7.
- Richert, L., P. Lavalle, E. Payan, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J.C. Voegel et C. Picart. 2004. « Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects ». *Langmuir*, vol. 20, p. 448-458.
- Rinaudo, Marguerite. 2006. « Chitin and chitosan: Properties and applications ». *Progress in Polymer Science*, vol. 31, n° 7, p. 603-632.
- Ruiz, Juan-Carlos, Amélie St-Georges-Robillard, Charles Thérésy, Sophie Lerouge et Michael R. Wertheimer. 2010. « Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability ». *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, n° 9-10, p. 737-753.
- Sailer, M., K. Lai Wing Sun, O. Mermut, T. E. Kennedy et C. J. Barrett. 2012. « High-throughput cellular screening of engineered ECM based on combinatorial polyelectrolyte multilayer films ». In *Biomaterials*. Vol. 33, p. 5841-7. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632764> >.
- Schermerhorn, M.L., A. J O'Malley, A. Jhaveri, P. Cotterill, F. Pomposelli et B.E. Landon. 2008. « Endovascular vs. Open Repair of Abdominal Aortic Aneurysms in the Medicare Population ». *The new england journal of medicine*, vol. 358, n° 5, p. 464-474.
- Schlenoff, J. B. , H. Ly et M. Li. 1998. « Charge and Mass Balance in Polyelectrolyte Multilayers ». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, p. 7626-7634.
- Schlenoff, Joseph B, et Delphine Laurent. 1997. « Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes ». *Langmuir*, vol. 13, p. 1552-1557.

- Schneider, A., G. Francius, R. Obeid, P. Schwinté, J. Hemmerlé, B. Frisch, P. Schaaaf, J.-C. Voegel, B. Senger et C. Picart. 2006. « Polyelectrolyte Multilayers with a Tunable Young's Modulus: Influence of Film Stiffness on Cell Adhesion ». *Langmuir*, vol. 22, p. 1193-1200.
- Serizawa, T., M. Yamaguchi et M. Akashi. 2002. « Alternating Bioactivity of Polymeric Layer-by-Layer Assemblies: Anticoagulation vs procoagulation of Human Blood ». *Biomacromolecules*, vol. 3, p. 724-731.
- Shah, N. J., M. L. Macdonald, Y. M. Beben, R. F. Padera, R. E. Samuel et P. T. Hammond. 2011. « Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films ». In *Biomaterials*. Vol. 32, p. 6183-93. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645919> >.
- She, Z., C. Wang, J. Li, G. B. Sukhorukov et M. N. Antipina. 2012. « Encapsulation of basic fibroblast growth factor by polyelectrolyte multilayer microcapsules and its controlled release for enhancing cell proliferation ». *Biomacromolecules*, vol. 13, n° 7, p. 2174-80.
- Silva, J. M., N. Georgi, R. Costa, P. Sher, R. L. Reis, C. A. Van Blitterswijk, M. Karperien et J. F. Mano. 2013. « Nanostructured 3D constructs based on chitosan and chondroitin sulphate multilayers for cartilage tissue engineering ». *PLoS One*, vol. 8, n° 2, p. e55451.
- Slabaugh, W. H. . 2012. « Interface of phases ». In *Access Science*, sous la dir. de Education, McGraw-Hill. < <http://www.accessscience.com/content/Contact-angle/348400#348400s002> >.
- Tan, Y., U. H. Yildiz, W. Wei, J. H. Waite et A. Miserez. 2013. « Layer-by-layer polyelectrolyte deposition: a mechanism for forming biocomposite materials ». *Biomacromolecules*, vol. 14, n° 6, p. 1715-26.
- Tang, Z., Y. Wang, P. Podsiadlo et N. A. Kotov. 2006. « Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering ». *Advanced Materials*, vol. 18, n° 24, p. 3203-3224.
- Temenoff, J.S., et A.G. Mikos. 2008. *Biomaterials: the intersection of biology and materials science*. Upper saddle river (New Jersey), 478 p.
- Thalla, P. , H. Fadlallah, B. Liberelle, P. Lequoy, G. De Crescenzo, Y. Merhi et S. Lerouge. 2014. « Chondroitin sulfate coatings display low platelet- but high endothelial cell- adhesive properties favorable for vascular implants ». *Biomacromolecules*.
- Tompkins, H. G., et E. A. Irene. 2005. *Handbook of Ellipsometry*. William Andrew, 887 p.

- Truica-Marasescu, Florina, et Michael R. Wertheimer. 2008. « Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Biomedical Applications ». *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, n° 1, p. 44-57.
- van der Bas, J. M., P. H. Quax, A. C. van den Berg, V. W. van Hinsbergh et J. H. van Bockel. 2002. « Ingrowth of aorta vascular cells into basic fibroblast growth factor-impregnated vascular prosthesis material: a porcine and human in vitro study on blood vessel prosthesis healing ». *J Vasc Surg*, vol. 36, n° 6, p. 1237-47.
- van der Bas, J. M., P. H. Quax, A. C. van den Berg, M. J. Visser, E. van der Linden et J. H. van Bockel. 2004. « Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 39, n° 4, p. 850-8.
- Vein center at memorial hospital, university of colorado health. 2014. « Abdominal Aortic Aneurysm ». en ligne. Consulté le 3 mars 2014.
- Volpato, F. Z. , J. Almodovar, K. Erickson, K. C. Popat, C. Migliaresi et M. J. Kipper. 2012. « Preservation of FGF-2 bioactivity using heparin-based nanoparticles, and their delivery from electrospun chitosan fibers ». In *Acta Biomater*. Vol. 8, p. 1551-9. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210184> >.
- Volpi, N. 2006. *Chondroitin Sulfate: Structure, role and pharmacological activity*. Californie, États-Unis: Elsevier, 600 p.
- Wenk, E., A. R. Murphy, D. L. Kaplan, L. Meinel, H. P. Merkle et L. Uebersax. 2010. « The use of sulfonated silk fibroin derivatives to control binding, delivery and potency of FGF-2 in tissue regeneration ». In *Biomaterials*. Vol. 31, p. 1403-13. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942287> >.
- White, D. J., S. Puranen, M. S. Johnson et J. Heino. 2004. « The collagen receptor subfamily of the integrins ». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 36, n° 8, p. 1405-10.
- Wikipedia. 2014. « Atherosclerosis ». en ligne. < <http://en.wikipedia.org/wiki/Atherosclerosis> >. Consulté le 13 février 2014.
- Williams, D.F. (368). 1999. *The williams Dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press.
- Yayon, Avner, Michael Klagsbrun, Jeffrey D. Esko, Philip Leder et David M. Ornitz. 1991. « Cellsurface, heparin-likemolecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor ». *Cell*, vol. 64, p. 841-848.

- Ye, X., H. Wang, J. Zhou, H. Li, J. Liu, Z. Wang, A. Chen et Q. Zhao. 2013. « The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells ». *PLoS One*, vol. 8, n° 1, p. 1-10.
- Zhang, J., B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J. C. Voegel et P. Lavalley. 2005. « Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid ». In *Biomaterials*. Vol. 26, p. 3353-61. England. NLM. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15603831> >.
- Zhong, H., O. Matsui, K. Xu, T. Ogi, J. Sanada, Y. Okamoto, Y. Tabata et Y. Takuwa. 2009. « Gene transduction into aortic wall using plasmid-loaded cationized gelatin hydrogel-coated polyester stent graft ». *Journal of vascular surgery*, vol. 50, n° 6, p. 1433-43.
- Zou, X. H., Y. Z. Jiang, G. R. Zhang, H. M. Jin, T. M. Nguyen et H. W. Ouyang. 2009. « Specific interactions between human fibroblasts and particular chondroitin sulfate molecules for wound healing ». *Acta Biomater*, vol. 5, n° 5, p. 1588-95.

